

蛹虫草菌种培养性状与出草结果关系的研究

方 华 舟

(荆楚理工学院 生物工程学院,湖北 荆门 448000)

摘 要:以不同保藏期及传代次数菌种为试验组,以优质母株为对照组,研究比较了各菌种培养性状与出草结果之间的关系,以期鉴别优质蛹虫草菌种提供依据。结果表明:菌种保藏1月或传代1次,固体平板培养菌丝洁白健壮、气生菌丝少匍匐状、长势好、转色快、转色深,液体培养菌丝球细密、粘稠、生物量高,出草形态好、产量最高;菌种保藏超过6月或传代超过3次,则菌丝色泽变暗、气生菌丝多呈棉絮状、转色迟、转色淡,液体培养菌丝球数量少、粗大、生物量低,产量显著较低。

关键词:蛹虫草;菌种;培养性状;产量

中图分类号:S 646.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0161-04

蛹虫草(*Cordyceps militaris* Link)属麦角菌科(Clavicipitaceae)虫草属(*Cordyceps* Link)模式种^[1]。为冬虫夏草近缘种,又名北冬虫夏草。王建芳等^[2]研究表明,蛹虫草具有与冬虫夏草相同或相似的活性成分,其主要活性成分如虫草素、虫草酸、虫草多糖、超氧化物歧化酶(SOD)、腺苷等含量接近或高于天然冬虫夏草,对消除疲劳、缓解紧张、提高人体免疫力、预防和治疗慢性支气管炎、肝炎、高血压、心脑血管疾病、肾炎肾衰、癌症肿瘤、性功能障碍等具有良好保健或治疗作用,是中国历史上名贵珍稀药用真菌,被认为是冬虫夏草的理想替代品^[3]。经多年努力,20世纪末我国率先在世界上实现人工栽培,尤其近年来,我国学者在蛹虫草培养基配方、生长条件等方面的研究取得了长足进展,并选育了一批性能好、产量高、活性成分丰富、适宜于人工栽培的蛹虫草品种,人工栽培及深加工产业开始初步形成^[3-4]。然而栽培实践及相关研究证明,蛹虫草菌种特别容易退化,一般经过一段时间保藏或传代,其菌种性能可发生严重衰退,产量及活性成分显著降低,甚至不转色、不出草,需经常对菌种进行复壮或选育新种^[5-7]。传统上菌种选育或复壮多以其实际栽培结果为基本检测手段^[8-10],时间长、工作量巨大,需一定设备及技术条件,一般虫草种植者难以采用,导致劣质菌种充斥市场,严重制约虫草业的健康发展。课题组在研究实践中发现,性能退化菌种的形态均发生一定程度改变,且不同菌种之间差别明

显。李美娜等^[11]、汪虹等^[12]在研究退化菌种中已发现多个基因等遗传物质与变异相关,证明遗传物质与出草结果之间有着对应关系,即遗传物质是菌丝生长、形态及出草的前提和基础。然而退化菌种遗传性状往往难以在菌种阶段予以充分和明显显现。模拟菌株生长主要性能需求实际,通过其培养特征反映遗传物质状况,对判断菌种性能及出草结果,更为简便、准确,对栽培实践及选育新优良菌种具有重要意义,但相关研究和报道较少。现以不同保藏期及传代次数菌种为试验组,以优质母株为对照组,研究比较了各菌种培养性状与出草结果之间的关系,以期鉴别优质蛹虫草菌种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试优质蛹虫草原始母种及各级菌种均由荆楚理工学院生物工程学院实验室保藏及提供,原始母种均经过栽培试验证实为优质菌种。马铃薯(市售)、蛋白胨(北京奥博星生物技术公司)、葡萄糖(化学纯,天津福晨化学试剂厂)、琼脂(北京奥博星生物技术公司)、磷酸二氢钾(化学纯,天津凯通化学试剂公司)、硫酸镁(化学纯,天津凯通化学试剂公司)、维生素B₁(药店购买,湖北华中药业公司)及其它常见药品。试验仪器:250B生化恒温培养箱(广东省医疗器械厂);LRH-250-GSH微电脑人工气候箱(广东省医疗器械厂);LXJ-IIB离心机(上海精密仪器仪表公司);恒温干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司);FA2104分析电子天平(上海良平仪器有限公司);SW-CJ-1F超净工作台(苏州净化设备有限公司);30 W移动式紫外灭菌灯(武汉延安医疗器械厂);TP22普通摇床(中国科学院武汉科学仪器厂);YX-400A高压蒸汽灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司);冰箱、显微镜、显微测微尺

作者简介:方华舟(1965-),男,湖北黄冈人,副教授,研究方向为食用菌技术与农业微生物学。E-mail: fanghuazhou2000@yahoo.com.cn.

基金项目:湖北省教育厅重点科研资助项目(D20126101)。

收稿日期:2012-03-13

以及其它常用消毒、接种及栽培工具等。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基制作 菌种保藏、培养及活化培养基(改良PDA培养基):马铃薯(去皮)200 g,葡萄糖 20 g,蛋白胨 5 g,磷酸二氢钾 1.0 g,硫酸镁 0.8 g,琼脂 15.0 g,水 1 000 mL,pH 自然(实测值约 6.5)。菌种液体培养基:可溶性淀粉 30.0 g,葡萄糖 10.0 g,蛋白胨 10.0 g,磷酸二氢钾 2.0 g,硫酸镁 2.0 g,VB₁ 10.0 mg,水 1 000 mL,pH 6.5。菌种菌丝生长形态检测培养基(平板培养基):马铃薯(去皮)200 g,葡萄糖 20.0 g,蛋白胨 3.0 g,琼脂 20.0 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.8 g,VB₁ 10.0 mg,水 1 000 mL,pH 自然。栽培出草培养基:大米 30 g,营养液 45 mL。其中营养液配方:蚕蛹粉 10 g,磷酸二氢钾 1.0 g,硫酸镁 0.8 g,VB₁ 10.0 mg,水 1 000 mL,pH 7.5。上述各培养基按常规方法配制,分别制作成相应固体或液体培养基^[13-15]。

1.2.2 试验设计 以原始优质母种为出发菌株,模拟菌种保藏、传代等常规菌种管理措施,将其分为 8 组。菌株①直接置于 4℃冰箱保藏 1 a;菌株②4℃冰箱保藏 6 个月;菌株③4℃冰箱保藏 3 个月;菌株④4℃冰箱保藏 1 个月;菌株⑤连续传 6 代(每月转接 1 次,下同,即传代 6 次);菌株⑥连续传 3 代;菌株⑦传 1 代;菌株⑧连续传代 3 次后 4℃冰箱保藏 3 个月。各菌种按常规活化,对照观察各菌株试管斜面菌丝形态;取约 1.0 mm 大小菌种,分别接种至菌种生长形态检测培养基,依次观察各菌株生长速度、菌丝形态、转色能力等情况;另各取约 5.0 mm 大小菌种,分别接入 100 mL 液体培养基中,摇床 150 r/min 培养 7 d,观察菌丝球及菌液状况;取 10 mL 菌液离心过滤,在电热恒温箱中烘干至恒重,比较生物量大小;液体菌种成熟后,按 10%接入出草培养基,置于人工气候箱适宜培养,比较观察栽培结果及质量。其中为了便于试验结果比较,菌株②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧等适时采用原始母种栽培出草、优质子实体组织分离制备。试验以原始母种为对照,各菌株均为 10 次重复,栽培出草 50 瓶重复。

2 结果与分析

2.1 不同处理母种菌株在试管斜面生长性状的比较

由表 1 可以看出,经过一段时间保藏或传代等处理后的试管菌种,其在斜面上的形态特征均发生了明显变化。总体上看,保藏时间短、传代次数少的菌株在菌丝色泽、形态、生长趋势等方面与对照组相接近,表现为菌丝洁白、气生菌丝少、匍匐状、健壮、长势好等。菌株①~④随着保藏时间延长,菌丝色泽由洁白逐渐变暗,气生菌丝由少逐渐变多、由匍匐状逐渐变绒毛状或棉絮状,菌丝由健壮逐渐变为瘦弱,生长趋势亦明显下降,其中菌株②、①分别保藏 6 和 12 个月,气生菌丝更加浓密、瘦弱、绒毛状、长势差、颜色变暗。菌株⑤~⑧则表现出

随传代次数增加气生菌丝明显增多,分别由浓密匍匐状演变为绒毛状、棉絮状或稀疏棉絮状,生长趋势明显下降,变化显著;其中菌株⑤与菌株⑧相比,菌株⑧气生菌丝更浓密,菌株⑤气生菌丝稀疏、生命力明显较差。说明蛹虫草菌种经过一段时间的保藏或传代,不仅其形态发生了明显改变,其生长性能及趋势亦发生了明显改变,且传代次数增加则表现更显著。与实际种植过程中常见菌种形态,如菌丝色泽、生长状况、菌丝浓密等,基本囊括。同时,该阶段试验结果,尤其菌丝健壮程度及生长趋势等差异,提示各菌种形态状况可能反映了菌种间较大的种性差异^[5-12]。

表 1 不同处理母种菌株在试管斜面生长性状比较

菌株	菌丝颜色	菌丝密度及形态	菌丝长势
①	较白	气生菌丝多,浓密,呈绒毛状	菌丝瘦弱,长势差
②	较白	气生菌丝较多,浓密,呈绒毛状	菌丝瘦弱,长势较差
③	洁白	气生菌丝较多,浓密,呈绒毛状	菌丝较瘦弱,长势一般
④	洁白	气生菌丝较少,较浓密,呈匍匐状	菌丝健壮,长势好
⑤	较暗	气生菌丝多,稀疏棉絮状	菌丝瘦弱,长势很差
⑥	较白	气生菌丝较多,浓密,呈绒毛状	菌丝较瘦弱,长势较差
⑦	洁白	气生菌丝较少,较浓密,呈匍匐状	菌丝健壮,长势较好
⑧	较暗	气生菌丝多,浓密,呈棉絮状	菌丝瘦弱,长势差
CK	洁白	气生菌丝少,较浓密,呈匍匐状	菌丝健壮,长势好

2.2 不同形态菌种转接至平板培养基上的生长情况

由表 2 可以看出,不仅各菌株菌落大小差别明显,且菌落形态、色泽等亦表现出明显差异。总体上看,菌株①~④和菌株⑤~⑦及菌株⑧分别与保藏期或传代次数的增加呈现出菌丝颜色变暗、气生菌丝明显增多、绒毛状或棉絮状、长势减弱、生长速度减慢、转色延迟、色泽变淡等递增性变化,且与表 1 比较,除见光转色等外与其试管斜面情况基本一致。其中菌株④、⑦分别在①~④和⑤~⑦及⑧组菌株中,菌丝洁白、健壮、长势好,气生菌丝少、菌丝密集、主要呈匍匐状,生长速度快、转色早、橘黄色,菌株③、②、⑥次之;菌株⑧气生菌丝多、瘦弱、长势较差、生长缓慢、浓密绒毛状或棉絮状,转色时间长、淡黄色;而菌株⑤则进一步表现为气生菌丝稀疏棉絮状、瘦弱、长势很差、生长缓慢、色暗,不转色。根据蛹虫草生长特性易退化、易变异等规律及表 1,菌株气生菌丝显著增多、生长速度显著减慢及菌丝瘦弱、长势变差、色泽变暗等,可说明是菌株性能显著退化或变异的重要宏观表现之一^[13-15];同时,见光转色是蛹虫草活性物质形成积累及栽培出草的重要必经阶段,不转色或色淡可表明相关转色基因变异、不表达或抑制^[11-14]。与种植实践中菌种经过长时间保藏或多次传代,菌丝更浓密、生长慢、转色迟、色淡或不转色、不出草的情况基本一致,说明菌种形态及生长特征的改变,表现了相应菌种性能的改变。分析其原因,可能与其经过较长时间生长或休眠,积累了某些物质抑制其基因表达或导致其发生变异有关^[11-12]。

表 2 不同形态菌种平板培养性状比较

菌株	培养前期			生长速度 /mm·d ⁻¹	培养后期 转色情况
	菌丝颜色	菌丝形态	菌丝长势		
①	较暗	浓密,绒毛状	瘦弱,长势较差	3.49dD	转色较慢,淡黄色
②	较白	浓密,绒毛状	较瘦弱,长势一般	3.76cC	转色较快,黄色
③	洁白	浓密,绒毛状	较健壮,长势较好	4.11bB	转色较快,黄色
④	洁白	较浓密,匍匐状	健壮,长势好	4.35aA	转色快,橘黄色
⑤	暗	稀疏,棉絮状	瘦弱,长势很差	2.88fE	不转色
⑥	较白	浓密,绒毛状	较健壮,长势一般	3.63dC	转色较快,黄色
⑦	洁白	较浓密,匍匐状	健壮,长势好	4.31aA	转色较快,橘黄色
⑧	暗	浓密,棉絮状	瘦弱,长势差	3.02eE	转色慢,淡黄色
CK	洁白	较浓密,匍匐状	健壮,长势好	4.37aA	转色快,橘黄色

注:表中不同小写和大写字母分别表示在 5%和 1%水平差异显著性,下同。

2.3 不同形态菌种在液体培养基中的培养情况

从表 3 可以看出,各菌株转接至液体培养已表现出明显差异。菌株④和⑦菌丝球最小、数量最多,菌液粘稠、生物量最高,③、②、⑥次之,与其它各菌株有显著差异。根据菌丝在液体培养规律,菌株长势好、生命力强,则细胞分裂快,菌丝生长迅速^[13],振荡培养时可形成更多生长中心,因而表现出菌丝球细小、数量多、菌液黏稠;对比表 1、2,情况基本相吻合,即延续了原菌种性能。说明液体培养下菌丝球细密、生物量高、粘稠,可作为优良蛹虫草菌种良好生长性能的重要表现性状之一。

表 4 不同状态母种菌株栽培出草情况比较

菌株	菌丝形态	满瓶时间/d	完成转色时间/d	出草情况	
				子实体形态	鲜重/g·瓶 ⁻¹
①	气生菌丝较多,长势较差	9	7	长约 3~5 cm,形态较差	11.3eE
②	气生菌丝较少,长势一般	8	5	长约 4~5 cm,形态较差	16.2cC
③	气生菌丝较少,长势较好	7	4	长约 7~8 cm,形态较好	17.6bB
④	气生菌丝少,长势好	7	3	长约 8~9 cm,形态好	18.7aA
⑤	气生菌丝稀疏色暗,长势很差	13	不转色	不出草	—
⑥	气生菌丝较少,长势一般	8	7	长约 3~4 cm,形态差	14.1dD
⑦	气生菌丝少,长势好	7	3	长约 8~9 cm,形态好	18.3aA
⑧	气生菌丝多色暗,长势差	11	淡黄色	泡状,色淡,形态很差	3.4fF
CK	气生菌丝少,长势好	7	3	长约 8~9 cm,形态好	18.8aA

2.5 菌种培养性能与出草结果

显然,遗传物质能否稳定遗传与表达是决定菌株生长过程、培养性状及栽培结果的关键和根本性因素^[6-12]。对比观察表 1~4,菌株在固体培养基表面洁白健壮、主要沿培养基表面匍匐状生长且气生菌丝少,液体培养菌丝球细密、粘稠、生物量高,则菌株生命力强、长势好、转色快、转色好、转色深(橘黄色或黄色),出草形态好、产量高,与对照组基本一致。其中,菌株①~④当保藏期超过 6 个月,及菌株⑤~⑦传代超过 3 次,菌丝形态、生长性状、出草结果有较明显或显著下降。说明菌株在固体及液体培养条件下的菌丝形态不仅良好反映其生长性能,亦良好反映其遗传性能及可表达状态。菌株⑧传代 3 次保藏 3 个月,其形态及性能均比菌株⑥(仅传代 3 次)和菌株③(仅保藏 3 个月)等单一性处理显著较差,亦

表 3 不同形态菌种液体培养性状比较

菌株	菌丝球直径 /mm	菌丝球浓密及 数量/个·mL ⁻¹	菌液状况	菌丝生物量 /mg·mL ⁻¹
①	较小,2.01	较稀疏,29.8	较清澈	17.1eE
②	较小,1.77	较浓密,39.9	较粘稠	19.8cC
③	较小,1.26	较稀疏,44.7	粘稠	21.3bB
④	小,1.07	浓密,49.3	粘稠	21.9bA
⑤	大,3.32	稀疏,11.8	清澈	11.6gG
⑥	较小,1.84	较浓密,33.6	较粘稠	18.7dD
⑦	小,1.16	浓密,47.1	粘稠	21.6bA
⑧	较大,2.46	稀疏,22.6	较清澈	15.2fF
CK	小,0.91	浓密,52.3	粘稠	22.4aA

2.4 栽培出草情况

从表 4 可以看出,各菌株栽培出草结果差异显著。菌株④和⑦子实体形态最好、产量最高(二者差距不显著),菌株③、②、⑥依次次之且差异明显,其它各菌株差异表现更显著,甚至不出草。观察栽培过程中菌丝生长状况,菌丝洁白健壮、长势好,则萌发快、吃料迅速、满瓶时间短、气生菌丝少,进而光照转色快、颜色深(橘黄色);菌株⑧萌发迟、吃料缓慢,气生菌丝浓密,转色时间长、色淡,子实体数量少、粗短、泡状,形态很差,出草时间长,鲜重仅为 3.4 g/瓶;菌株⑤菌丝色暗、生长弱,不转色、不出草。对照表 1~3,与各菌株在生长过程中所表现性能,有着较明显的一致性。说明菌种培养形态可良好反映菌种固有性能^[13,16]。

说明这一点。从遗传学角度进行分析,保藏期短、传代次数少,菌株有害代谢物质积累少,不影响其菌株性状遗传及表达或影响显著较小;而保藏期超过 6 个月及传代超过 3 次,菌株积累有害物质较多,遗传物质发生了改变,因而菌种培养性能发生明显改变;其变异速度较快系蛹虫草菌株生长特性所致。菌丝形态典型,反映其旺盛的生长性能及良好的遗传表达能力,有利于菌丝迅速渗入其培养基内部,吸收营养快速生长,合成和积累系列功能性物质,减少有害代谢物质形成和积累,从而从根本上保证菌丝性状表达和出草效果。

3 结论与讨论

该试验结果表明,菌种固体培养菌丝洁白健壮、气生菌丝少匍匐状、长势好、转色快、转色深,液体培养菌

丝球细密、粘稠、生物量高,则菌种生命力强,出草形态好、产量高。该试验中,菌种低温保藏 1 月或传代 1 次,平板培养菌丝体向四周呈匍匐状生长,洁白健壮、气生菌丝少,见光转色快、转色深,液体培养菌丝球细密、粘稠、生物量高,草体形态好、产量依次最高;但随着保藏期的延长,尤其是随着传代次数的增加,由于代谢物质积累更多等原因导致遗传物质变异速度加快,菌种培养菌丝色泽变暗、气生菌丝明显增多、生长缓慢、转色迟、转色浅甚至不转色,液体培养菌丝球粗大、稀疏、生物量小,产量及草体形态显著降低,甚至不出草。菌种传代次数越少或保藏期越短,菌种培养性状及出草结果越与原始母种相接近,表明菌种培养性状与出草结果之间具有显著相关性,且与李亚洁等^[8]、袁雪芬^[9]、锁现民等^[10]试验结果基本一致,可作为判断该菌种是否具有优良出草性能的重要依据之一。种植实践中,蛹虫草种植者所购买或引进菌种,但大多均经过一段时间低温保藏或扩繁传代,菌种性能可能已严重退化,甚至根本不具有优良性状,可依据该试验结果,结合菌种活化及菌种扩大培养过程,鉴定菌种性能状况,可确保出草和产品收成。

该试验中以固体培养反映菌种菌株宏观生长情况及转色性能,以液体培养反映微观条件下菌丝生长能力及生物量情况,可全面检测菌种性能,菌丝生长快、生物量巨大、转色快、转色深表明菌丝吸收营养迅速、生长品质好、产量高,因而具有较高生产及应用价值。我国地域辽阔,野生蛹虫草资源丰富,其中不乏优秀菌株,以该研究结果为主要初筛手段,不仅可大幅减轻工作强度,更易于筛选出优秀菌株。至于试验中菌种形态与其平板培养、液体培养及其出草结果具有较大一致性现象,根本原因系菌种性能决定所致,但该试验显示当保藏期超过 6 个月,因菌种菌丝生长条件限制等则开始表现出不一致;同时还应

该看到,该试验仅对菌种主要性能进行跟踪观察,对菌种性能完整测定仍应以栽培试验结果为准。

参考文献

- [1] 中国科学院中国孢子植物志编辑委员会. 中国真菌志(第三十二卷·虫草属)[M]. 北京:科学出版社,2007.
- [2] 王建芳,杨春清. 蛹虫草人工栽培及产品开发研究概况[J]. 时珍国医国药,2006(2):268.
- [3] 李昊,吴白昌,李春兰. 虫草人工栽培与深度开发[M]. 北京:科学技术文献出版社,2003:3-5.
- [4] 张胜友. 新法栽培蛹虫草[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2010.
- [5] 曲燕,区智. 蛹虫草的研究进展[J]. 现代农业科技,2012(12):42-43.
- [6] 郑壮丽,黄春华,梅彩英,等. 蛹虫草国内外研究的新进展[J]. 环境昆虫学报,2011,33(2):225-233.
- [7] 韩燕峰,梁建东,杜文,等. 蛹虫草几个问题的最新研究进展[J]. 微生物学报,2009,36(9):1423-1428.
- [8] 李亚洁,王鹤,孟楠,等. 蛹虫草菌种复壮技术的研究[J]. 食用菌,2006,28(2):23-26.
- [9] 袁雪芬. 优质蛹虫草菌种的快速选育方法[J]. 安徽农学通报,2012,18(7):62-63.
- [10] 锁现民,蔡树威,张现法. 浅谈蛹虫草栽培菌种制作及鉴定[J]. 食用菌,2009(4):41-42.
- [11] 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,2003,22(2):277-282.
- [12] 汪虹,魏静,林楠,等. 交配型基因作为分子标记鉴定蛹虫草退化菌株的核相初步研究[J]. 食用菌学报,2010,17(4):1-4.
- [13] 耿丽娟,何莉莉,鄂玉洋,等. 菌种保藏条件对蛹虫草菌丝生长及产量的影响[J]. 沈阳农业大学学报,2009,40(2):165-168.
- [14] 方华舟,董海波,肖习明,等. 不同保藏温度及光照条件对北冬虫草菌种质量的影响[J]. 中国农学通报,2011,27(22):247-252.
- [15] 方华舟,董海波,肖习明,等. 保藏温度、时间及代次对蛹虫草菌种质量的影响[J]. 荆楚理工学院学报,2011,26(2):5-10.
- [16] 高新华. 蛹虫草的交配型研究[J]. 食用菌学报,2008,15(1):1-5.

(致谢:吴永永、王泽锋、姜忠祥等同学为该试验付出大量心血,在此深表感谢!)

Study on the Relationship Between Cultural Characteristics and Results of Weeds of *Cordyceps militaris*

FANG Hua-zhou

(Faculty of Bioscience Engineering, Jingchu Science and Technology College, Jingmen, Hubei 448000)

Abstract: Taking the bacterial strains come from different storage periods and the times of passage as experimental group, regarding quality material as matched group, the relationship between cultural characteristics and results of weeds were studied, in order to provide a basis for identification of high quality strains of *Cordyceps militaris*. The results showed that if the strains were stored for a month or continuous cell culture only for one time, bacterial strains by solid culture were white and strong, little creeping shaped hyphae, growth better, turned color faster and turned color deeper, and bacterial strains by liquid culture had close, thick, high-biomass bacterial strains and the most production; while if stored for more than six months and continuous cell culture more than three times, bacterial strains by liquid culture were gloomy, much gossypine, turned color later and weaker, and bacterial strains by liquid culture were thick, little production, low-biomass and the production obviously got low.

Key words: *Cordyceps militaris*; bacterial strains; cultural characteristics; production