

北冬虫夏草寄主体培养关键技术研究

秦秀丽, 邢力, 尹锐

(吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

摘要:以野生北冬虫夏草为试材,研究了北冬虫夏草寄主体培养关键技术。结果表明:液体菌种的最佳菌龄为 7~9 d,用臭氧水进行蛹体表面消毒其效果最佳,接种时在蚕蛹翅的下缘进行接种易操作,出血少,僵化率高;通过正交实验确定发菌时适宜的条件为温度 20~22℃,空气湿度 60%,在无光条件下进行发菌,其僵化率最高;出草的适宜条件为温度 20~22℃,空气湿度 60%~70%,光照强度 250~500 lx,其蛹虫草长势最好,得到的蛹虫草干重高。

关键词:北冬虫夏草;液体菌种;发菌;僵化率;出草

中图分类号:S 567 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)17-0157-04

北冬虫夏草(North Cordyceps)属麦角菌科虫草属的模式种^[1],又名蛹虫草,以其较好的抗肿瘤、抗病毒、抗菌消炎、抗疲劳及增强机体免疫力^[2-6]等作用愈来愈受到人们的关注。大量的药物化学、物理及临床研究表明,蛹虫草的药效与冬虫夏草极为相似,其主要药用成分虫草素、虫草酸、虫草多糖含量及 SOD 活性等均高于冬虫夏草^[7-8],冬虫夏草因生境特殊,寄主专一,不能进行人工培养,价格昂贵。与冬虫夏草相比,蛹虫草对环境条件要求不严格,适应性较强,较易进行人工培养^[11]。由于北冬虫夏草具有很好的医疗保健功能,目前国内外已开发出多种虫草产品(包括药品和保健食品),近年来市场对北冬虫夏草的需求逐渐增大,对其外观和品质要求也越来越高^[9-10]。北冬虫夏草的人工培养方式主要是以蚕蛹为寄主昆虫进行寄主体培养,但由于生产者对北冬虫夏草人工培养的关键技术掌握不好,在人工培养过程中常导致污染严重,不出草,以及畸形草的现象,严重地影响了北冬虫夏草的产量和质量,制约了北冬虫夏草人工培养技术的发展。为此,现对北冬虫夏草培养的关键技术进行研究,旨在探索出北冬虫夏草寄主体培养的适宜条件,为北冬虫夏草的大规模生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株是由吉林农业科技学院微生物实验室以野生北冬虫夏草为材料分离纯化得到的纯菌种。培养室(内设栽培架,宽 60 cm,高 150 cm,分 4 层,每层间隔 30 cm,底层离地面 30 cm,内设有可调节光强的荧光灯

及紫外线灯,在使用的前 3 d 要进行彻底的消毒处理);AL204 电子天平;SW-CJ-2G 型净化工作台;HWS-250 型智能光照培养箱;LS-B35-I 立式压力蒸汽灭菌器;DHZ-型恒温振荡培养箱;DADE-1 电热恒温干燥箱;TS-20 臭氧发生器;TP311 型台式精密酸度计。柞蚕蛹,马铃薯,葡萄糖,蛋白胨,牛肉膏,琼脂, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KMnO_4 , 75%酒精及酒精棉球。罐头瓶(500 mL),硬质塑料盘(长 60 cm,宽 35 cm,高 6 cm),使用前进行消毒处理,医用一次注射器(20 mL)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化 PDA 加富培养基:马铃薯 20%(煮汁 15 min,4 层纱布过滤),葡萄糖 2%,蛋白胨 1%,琼脂 2%,蚕蛹 5%(煮汁 10 min,4 层纱布过滤),pH 5.5~6.5^[11]。蚕蛹剪碎放入铝锅中煮沸 10 min,用 4 层纱布过滤取汁,将配制的培养基装入 18 mm×180 mm 的试管中,经高压蒸汽灭菌后,制成斜面试管培养基,在无菌条件下接种,在 22℃下培养 7 d,挑选菌丝洁白、生长健壮、浓密、无污染的斜面试管作为供试菌种。

1.2.2 液体菌种的培养及检验 液体培养基配方:马铃薯 20%(煮汁 15 min,4 层纱布过滤),葡萄糖 2%,牛肉膏 1%,蛋白胨 2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, KH_2PO_4 0.1%,pH 6.0。取 250 mL 液体培养基装入 500 mL 的三角瓶中,灭菌后在无菌条件下接入 0.5 cm² 北冬虫夏草斜面菌种 4 块,放入电热振荡培养箱中,在 22℃下静止培养 24 h,然后在转速为 140 r/min,温度为 22℃的条件下,振荡培养 5 d 时终止培养,即制得液体菌种^[12]。然后对液体菌种进行严格检验。合格液体菌种为菌液清澈不混浊,菌丝球多,小而形状均匀一致,无异味。

1.2.3 寄主体培养技术流程 选蛹(选择发育良好,活体饱满,无病无伤的蚕蛹)→蛹体表面消毒处理→注射接种(注射合格液体菌种)→(将接种后的蚕蛹摆放到塑料盘中)发菌管理→僵化蛹→(将僵化蛹放入消毒的 500 mL 的罐头瓶中)出草管理→采收。

第一作者简介:秦秀丽(1966-),女,本科,副教授,现主要从事微生物及食药菌的教学与科研工作。E-mail:qinxiuli88@126.com.

基金项目:吉林省教育厅“十一五”科学技术研究资助项目(吉教科合字[2011]第 274 号);吉林省科技厅发展计划资助项目(201105071)。

收稿日期:2013-04-22

1.2.4 最佳菌龄筛选试验 将同支试管菌种接种到 5 瓶装有 250 mL 液体的培养基中,进行振荡培养,然后将无污染的液体菌种,在菌种培养的 3、5、7、9、11、13 d 注射接种 400 个(每 100 瓶为 1 个重复)表面消毒的蚕蛹,将接种后的蚕蛹摆放到塑料盘中在相同的条件下进行发菌管理,记录其僵化所需要天数、僵化率及出草情况,筛选液体菌种的最佳菌龄。

1.2.5 蛹体表面消毒方法的筛选试验 将选好的 400 个蚕蛹(每 100 个为 1 个重复)分别用 75% 的酒精、0.1% 的 KMnO_4 、臭氧水(在水中的溶解度为 49.4 mL/100mL)浸泡 10 min,0.1% 的升汞水浸泡 5 min 进行表面消毒处理,用 4 种方法消毒后,再用无菌水冲洗 4 次,然后在无菌条件下注射培养 7 d 的液体菌种,将接种后的蚕蛹摆放到塑料盘中在相同的条件下进行发菌管理,记录其僵化率、僵化所需要天数,确定蛹体表面最佳消毒方法。

1.2.6 注射部位的选择 为了确定最佳的注射部位,分别取 400 个(每 100 瓶为 1 个重复)已消毒的蚕蛹,在蛹的头部、翅的下缘、背部第 2 环节、腹部第 3 环节等不同部位,在无菌条件下注射培养 7 d 的液体菌种,每 1.0 mL 注射 5 个蚕蛹,将接种后的蚕蛹摆放到塑料盘中在相同的条件下进行发菌管理,记录其僵化率、僵化所需要天数,确定蛹体最佳注射部位。

1.2.7 适宜发菌条件的优化 取选择好的优质蚕蛹,在无菌条件下,在翅的下缘注射培养 7 d 的液体菌种,将接种后的蚕蛹摆放到塑料盘中,以温度、湿度、光照强度为试验因素,设计 $L_9(3^3)$ 正交实验(表 1)分别进行发菌管理,在发菌过程中适当进行通风,每组试验注射 200 个蚕蛹,共 3 次重复,培养 10 d 后,记录其僵化率,确定发菌管理的最佳条件。

表 1 $L_9(3^3)$ 发菌条件正交实验设计

水平	因素		
	A: 温度/℃	B: 湿度/%	C: 光照/lx
1	20	50	无光
2	22	60	50~150
3	24	70	200~300

1.2.8 适宜出草条件的优化 取同一批僵化蛹,放入消毒的 500 mL 的罐头瓶中,每瓶放置 7~8 个,用消毒聚乙烯塑料及胶皮筋封口。将罐头瓶放置在智能光照培养箱中,以温度、湿度、光照强度为试验因素,设计 $L_9(3^3)$ 正交实验(表 2)分别进行出草管理,每组 500 g 蚕蛹,共 3 次重复,在出草过程中适当进行通风,培养 30 d 进行采收,将采收的蛹虫草在 80℃ 下烘 2 次,每次 2 h,称重,以干蛹虫草重量为指标,确定最佳出草条件。

表 2 $L_9(3^3)$ 出草条件正交实验设计

水平	因素		
	A: 温度/℃	B: 湿度/%	C: 光照强度/lx
1	20	50	100~200
2	22	60	250~350
3	24	70	400~500

2 结果与分析

2.1 菌龄对蚕蛹僵化的影响

由图 1、2 可知,北冬虫夏草液体菌种的培养天数对蚕蛹的僵化天数、僵化率及出草率有显著的影响。用培养第 3 天的液体菌种对蚕蛹进行注射接种,其僵化天数较长,且僵化率较低,但出草率高于僵化率。主要原因是因为菌种培养的时间较短,菌液中菌丝球少,浓度较低,注射接种时,注射到蚕蛹体内的菌丝量少,有一部分蚕蛹体内没有注入菌丝,所以只有一部分僵化,僵化率较低,僵化时间较长,但 80% 都能出草。没有僵化的蚕蛹,由于培养室内的温度达到 20℃ 左右,散发出异味,如果不及及时挑出,就会腐烂发臭。随着培养时间的延长,僵化天数缩短,僵化率及出草率逐渐提高。当液体菌种培养 7~9 d 时,菌液中菌丝球浓密,浓度较高,菌丝生长快,僵化天数最短,僵化率及出草率达到 97% 以上。当液体菌种培养到 11~13 d 时,菌液中的菌丝球浓度也较高,但由于培养时间较长,使菌种出现老化,生活力降低,接入蚕蛹体内其侵染力下降,致使僵化时间延长,僵化率和出草率逐渐下降。

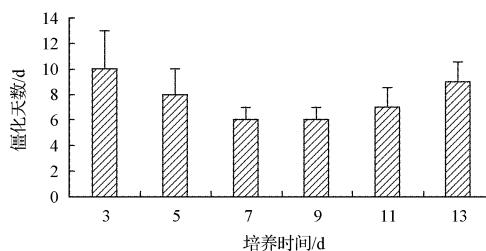


图 1 液体菌种的菌龄对僵化天数的影响

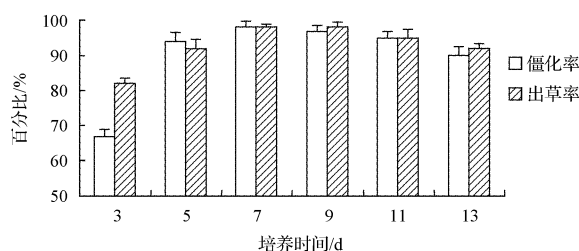


图 2 液体菌种的菌龄对僵化率及出草率的影响

2.2 蛹体表面消毒方法对蚕蛹僵化的影响

由图 3、4 可知,对蛹体用 75% 的酒精、0.1% 的 KMnO_4 、臭氧水(在水中的溶解度为 49.4 mL/100mL)浸泡 10 min,0.1% 的升汞水浸泡 5 min 进行表面消毒处理,其中,用臭氧水和 0.1% 升汞水进行消毒的蚕蛹僵化天数最少,僵化率最高;其次是 75% 酒精进行消毒的蚕蛹,而用 0.1% 的 KMnO_4 进行消毒的蚕蛹僵化天数最多,僵化率最低。从出草率情况来看,这 4 种消毒方法处理蚕蛹出草率没有明显的差异,0.1% 的 KMnO_4 消毒的蚕蛹出草率最低为 94%,而臭氧水和 0.1% 升汞水进行消毒的蚕蛹出草率最高为 97%。可见臭氧水和 0.1%

升汞水是 4 种方法中蛹体表面消毒效果较好的方法。但由于 0.1% 升汞水含有重金属离子 Hg, 如果消毒处理后, 对蚕蛹冲洗的次数少, 在蛹体表面就会部分残留, 对人体健康造成危害, 因此, 在这 4 种方法中首选的方法是用臭氧水进行蛹体表面消毒。

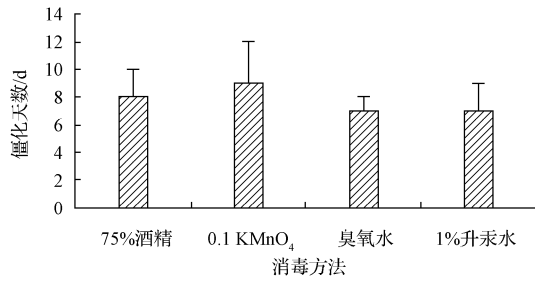


图 3 不同消毒方法对僵化天数的影响

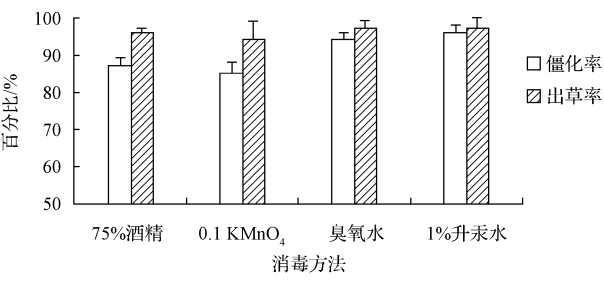


图 4 不同消毒方法对僵化率及出草率的影响

2.3 不同注射部位对蛹体僵化的影响

由表 3 可知, 在蛹体翅下缘进行注射接种, 蛹体的僵化天数最短, 僵化率最高, 易注射, 而且蛹体出血少。在蛹的头部进行注射接种, 蚕蛹死的快, 菌液易溢出, 留在蛹体内的菌种量少, 僵化天数长, 并且菌液溢出后易污染, 致使其僵化率降低。而在蛹体的背部 2~3 环节及腹部 3~4 环节进行注射接种, 僵化天数都比在蛹体翅下缘进行注射接种时间长, 由于接种后出血多, 放入培养室内发菌时, 易污染, 其僵化率低于在蛹体翅下缘进行注射接种。因此, 在进行接种时, 首选的接种部位为蚕蛹翅的下缘。

表 3 不同注射部位对蛹体僵化的影响

观察记录项目	蛹体注射部位			
	蛹的头部	翅的下缘	背部 2~3 环节	腹部 3~4 环节
僵化天数/d	10	7	8	9
僵化率/%	73	97	90	86
注射后蛹体情况	死的快菌液易溢出	易注射出血少	易注射出血多	易注射出血多

2.4 适宜发菌条件的优化

由表 4 可知, 发菌的适宜条件为 $A_2B_2C_1$, 即发菌的适宜温度为 22℃, 空气湿度为 60%, 在无光条件下进行发菌。观察极差 R 发现, 光照强度是影响发菌的最主要因素, 温度和空气湿度条件对发菌的影响相当。试验证明, 发菌时温度低, 菌丝生长慢, 僵化时间长; 温度高, 易发生杂菌污染, 僵化率低。从表 4 可以看出, A_1 和 A_2 的僵化率相差很小, 因此, 发菌的适宜温度为 20~22℃;

发菌时空气湿度低, 蛹体表面干燥, 菌丝生长慢, 如果湿度过低, 会导致菌丝死亡; 空气湿度高, 易发生杂菌污染, 都会降低僵化率。从表 3 还可以看出, 在发菌过程中 B_2 和 B_1 的僵化率相差很小, 因此, 在发菌过程中空气湿度应控制在 60% 左右; 在发菌过程中, 随着光照的增强, 菌丝生长越慢, 在无光或弱光条件下, 菌丝长势良好。

表 4 $L_9(3^3)$ 发菌条件正交实验结果

序号	A_1 温度/℃	B_1 湿度/%	C_1 光照强度/lx	僵化率/%
1	1	1	1	91
2	1	2	2	94
3	1	3	3	81
4	2	1	2	95
5	2	2	3	86
6	2	3	1	93
7	3	1	3	77
8	3	2	1	92
9	3	3	2	85
k_1	89	88	92	
k_2	91	91	91	
k_3	85	86	81	
R	6	5	11	
	A_2	B_2	C_1	

2.5 适宜出草条件的优化

由表 5 可知, 蛹虫草出草的适宜条件为 $A_2B_2C_3$, 即温度为 22℃, 空气湿度为 60%, 光照为 400~500 lx。但从表 3 可以看出, B_2 与 B_3 、 C_2 与 C_3 对蛹虫草生长的影响相差不大, 因此出草时湿度条件为 60%~70%, 光照条件为 250~500 lx。观察极差 R 发现, 温度强度是影响出草最主要因素, 其次是光照强度, 空气湿度对出草的影响最小。试验证明, 在出草时温度高, 不利于子座的分化; 在出草过程中需要充足的散射光照, 光线弱不利于子座的生长, 虫草颜色浅, 影响虫草的质量。蛹虫草生长过程中, 由于罐头瓶口是用塑料封口, 具有较好的保水性, 另外, 蛹虫草生长过程中, 进行呼吸作用, 产生一定的水分, 因此空气湿度对子座生长影响较小。

表 5 $L_9(3^3)$ 出草条件正交实验结果

序号	A_1 温度/℃	B_1 湿度/%	C_1 光照强度/lx	蛹虫草干重/g
1	1	1	1	78.5
2	1	2	2	88.4
3	1	3	3	86.7
4	2	1	2	92.4
5	2	2	3	96.2
6	2	3	1	87.2
7	3	1	3	79.8
8	3	2	1	82.1
9	3	3	2	85.5
k_1	84.5	83.7	82.6	
k_2	91.9	88.9	87.6	
k_3	82.5	86.5	88.2	
R	9.4	5.2	5.6	
	A_2	B_2	C_3	

3 结论

液体菌种的菌龄对蚕蛹的僵化率及蛹虫草的产量和质量有显著的影响。该研究表明,人工培养蛹虫草其液体菌种的最适菌龄在7~9 d。液体菌种培养时间短,由于菌液中菌丝少,菌丝的浓度低,致使僵化率较低,僵化时间长,出草率也较低。随着培养时间的延长,菌液中菌丝量的增加,菌丝浓度也逐渐增加,僵化率及出草率逐渐增加,僵化时间逐渐缩短。当液体菌种培养超过9 d后,虽然菌丝的浓度较高,但由于培养时间长,菌丝生活力逐渐下降,致使僵化率和出草率逐渐下降,僵化时间增加。因此进行蛹虫草人工培养,应选择适宜菌龄的液体菌种。用蚕蛹进行寄主体培养蛹虫草,对蛹体的表面消毒是其中一个重要环节。如果对蛹体消毒处理不彻底,在注射接种后,由于发菌的温度在20℃以上,致使杂菌迅速生长,最终导致蛹体发生杂种污染而腐烂发臭,污染严重导致绝收,严重影响经济效益。该研究表明,在几种消毒方法中,用臭氧水进行蛹体表面消毒,消毒处理的效果比较好,同时与0.1%升汞水相比,没有重金属离子的残留,不会对人体健康造成影响。

在蛹体接种时首选的接种部位为蚕蛹翅的下缘,易操作,出血少,其蛹体僵化率最高。在此部位接种时,注射器应向头部与蛹体平行进针,针尖稍向下倾斜,插入针头1~2 cm注入液体菌种1.0 mL,然后迅速抽出针头,动作要快。在往塑料盘中摆放时,针口应朝上,防止菌种及蛹体内物质溢出。

发菌的适宜条件是温度为20~22℃,空气湿度为60%,无光条件,同时要适当进行通风。在发菌过程中,要经常对接种后的蛹体进行检查,当培养5 d后,要挑除没有僵化蛹体变软的蚕蛹;当培养15 d左右时,当菌丝长满蛹体时,给予弱光照射,当蛹体和环节间的菌丝变成淡褐色时,标志着营养生长即发菌阶段结束。当菌丝长满蛹体,蛹体和环节间的菌丝变成淡褐色时,将僵化

的蛹体装入罐头瓶中,进入出草阶段,要提供出草适宜的环境条件。该研究结果表明,出草时的适宜条件是温度为20~22℃,空气湿度为60%~70%,光照强度为250~500 lx,每天照射10 h以上,同时要适当进行通风。在出草阶段,如果室内光线不足,要用日光灯增强光照,并给予充足的散射光照。另外蛹虫草子座在生长过程中,有很强的趋光性,因此在出草过程中要经常调整瓶子的方向,防止蛹虫草在瓶内弯曲生长^[13],以保证蛹虫草的质量。

参考文献

- [1] 曾宏彬,宋斌,李泰辉,等. 蛹虫草研究进展及其产业化前景[J]. 食用菌学报,2011,18(2):70-74.
- [2] 李军,陈广生,方清茂,等. 人工培养北冬虫夏草与冬虫夏草的比较研究[J]. 成都中医药大学学报,2010,33(3):82-84.
- [3] Kim Y C. Cordyceps sinensis[J]. American Journal of Chinese Medicine,1996,24(2):111-125.
- [4] Ionnidis P,Courtis N,Havredaki M,et al. The polyadenylation inhibitor cordycepin cause a decline in c-MYC mRNA levels without effecting c-MYC protein level[J]. Oncogene,1999,18(1):117-125.
- [5] Zhou X X,Meyer C U,Schmidtke P,etal. Effect of cordycepin on interleukin-10 productions of human peripheral blood mononuclear cells[J]. European Journal of Pharmacology,2002,453:309-317.
- [6] 张显科,王玉柱,刘文霞. 蛹虫草与冬虫夏草化学成分比较[J]. 辽宁大学学报,1996,23(4):20-23.
- [7] 张平,朱述钧,钱大顺,等. 北冬虫夏草功能成分及保健作用分析[J]. 江苏农业科学,2003(6):105-107.
- [8] 金凌云,杜双田,马璐,等. 蛹虫基质的模型优化研草栽培[J]. 西北农林科技大学,2009,37(11):155-159.
- [9] 王兰珍,林桂荣. 不同培养条件对北冬虫夏草原基形成的影响[J]. 福建农业科技,2009(4):44-47.
- [10] 林群英,宋斌,钟月金,等. 北冬虫夏草人工栽培条件优化研究[J]. 中国食用菌,2006,25(6):17-18.
- [11] 穆忠平. 蛹虫草高产培育技术[J]. 食用菌,2004(5):36-37.
- [12] 秦秀丽,杨国会,李凤林. 北冬虫夏草液体深层发酵的研究[J]. 北方园艺,2010,23(6):167-170.
- [13] 马文石,李凤芹,金英. 柞蚕北冬虫夏草栽培技术[J]. 食用菌,2008(4):45-46.

Study on the Key Cultivation Technology of North Cordyceps Host

QIN Xiu-li, XING Li, YIN Rui

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

Abstract: Taking wild North Cordyceps as material, the key cultivation technology of North Cordyceps host was conducted. The results showed that the best bacteria age of liquid strains was 7~9 d, ozone solution was the best surface disinfection of pupa body, it was easy operation by inoculate on the lower edge of silkworm pupa wing and bleeding less, with high rigid rate. Suitable conditions were determined by the orthogonal test, the results showed that the suitable temperature for the hyphae growth was 20~22℃, relative air humidity was 60%, the pupa rigid rate was the highest in no light condition. The suitable conditions for the sporocarp growth as follows, temperature for 20~22℃, relative air humidity for 60%~70%, light density for 250~500 lx, under this condition, the North Cordyceps growth was the best, the dry weight of North Cordyceps was the highest.

Key words: North Cordyceps; liquid strain; hyphae growth; pupa rigid rate; sporocarp growth