

# 高寒地区蛹虫草大米培养基的优化

孙慧娟, 谢 荣, 熊卫萍, 张君丽, 白玛旦增, 洛 桑

(西藏农牧科学院 蔬菜研究所, 西藏 拉萨 850032)

**摘 要:**以引进西藏的 6 株蛹虫草为试材, 对比研究了其菌丝生长速率、出草产出及长势, 筛选优良的蛹虫草菌株, 并通过正交实验筛选对蛹虫草大米培养基营养成分的最优水平组合。结果表明: 蛹虫草“TAAAS1”的菌丝生长速率虽不是最快的, 但出草整齐均匀, 出草产出高于其它菌株, 表明“TAAAS1”菌株是适宜在高寒地区栽培生产的好品种; 蛹虫草大米培养基的最优水平组合为蛹粉 4 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 硫酸镁 2 g/L, 磷酸二氢钾 1.5 g/L。

**关键词:**蛹虫草; 菌株; 培养基

**中图分类号:**Q 949.327.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)02-0143-03

蛹虫草[*Cordyceps militaris* (L.) Link]属于子囊菌亚门、麦角菌目、麦角菌科、虫草属的模式种, 又名北冬虫夏草、北虫草等, 它寄生在夜蛾科等蛹体上, 与冬虫夏草同属不同种<sup>[1]</sup>。蛹虫草是我国名贵中药材的一种, 具有很高的食用和药用价值<sup>[2]</sup>, 北虫草中的多糖、虫草素等成分对哮喘及支气管疾病、免疫调节、抗肿瘤等方面都表现出很好的治疗效果<sup>[3-5]</sup>。经过科研人员多年的精心研究, 蛹虫草的人工栽培已经达到工厂化的规模<sup>[6]</sup>。但在栽培的过程中存在着一个虫草属真菌普遍存在的破解难题即菌种退化, 即使在人工栽培技术成熟的今天也难以避免的。空气稀薄, 气压低, 氧气少, 含尘量和水汽含量, 是西藏高原气候的重要特征。这些特征都对蛹虫草子实体生长阶段(需高湿度、通风减少二氧化碳的积累)造成了一定的影响。所以, 亟需筛选性状稳定、不易退化、适宜西藏地区栽培的虫草菌种。

该研究主要针对目前在人工栽培过程中, 蛹虫草菌种退化普遍且严重, 给规模化栽培带来了极大的风险。选取近年来引进西藏的 6 个蛹虫草菌株进行菌丝生长速率和栽培出草蛹虫草试验, 筛选出优良的蛹虫草菌株, 为高寒缺氧地区稳定产出提供依据; 据报道, 葡萄糖

能促进蛹虫草的菌丝生长和虫草素的合成, 而淀粉有利于多糖的合成, 不利于虫草素的合成<sup>[7]</sup>。蚕蛹粉是蛹虫草栽培过程中的最佳氮源<sup>[8-9]</sup>。该试验分别以葡萄糖和蚕蛹粉作为碳氮源, 通过改变其含量, 研究优良菌株大米培养基配方, 以期蛹虫草在高寒地区的栽培提供一定的理论基础, 解决实际生产问题, 带动当地经济发展, 促进农民致富。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 供试菌株的具体信息见表 1。

表 1 供试菌株来源及引进时间

Table 1 The source and introducing time of the tested-strains

菌株编号 Strain screening number	菌株来源及名称 Source and name of strain	引进时间 Introduction date /(年-月)
A	西藏农牧科学院蔬菜所“TAAAS1”	—
B	江苏农业科学院“尖头草”	2011-04
C	江苏农业科学院“圆头草”	2011-04
D	西藏农牧科学院蔬菜所“TAAAS2”	—
E	中国农业科学院资区所“大头草”	2012-03
F	园区“西藏现代农业公司”	2012-08

1.1.2 培养基 1) PDA 加富培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蛋白胨 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g,  $\text{MgSO}_4$  1.5 g, 维生素  $\text{B}_1$  10 mg, 加水至 1 000 mL; 2) 液体培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g, 维生素  $\text{B}_1$  10 mg, 加水至 1 000 mL; 3) 营养液: 葡萄糖 60 g, 蚕蛹粉 30 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4$  3 g, 加水 6 000 mL; 4) 栽培培养基: 大米 30 g, 营养液 40 mL。马铃薯处理: 去皮后称重, 切块, 水开后继续煮 0.5 h, 8 层纱

**第一作者简介:**孙慧娟(1987-), 女, 黑龙江鹤岗人, 硕士, 研究实习员, 研究方向为食用菌。E-mail: 731001601@qq.com.

**责任作者:**谢荣(1981-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向为食用菌。E-mail: xr-20082004@163.com.

**基金项目:**国家现代食用菌产业技术体系拉萨综合试验站资助项目(CARS-24); 西藏财政预算内资助项目。

**收稿日期:**2015-09-24

布过滤除渣。培养基灭菌条件:121℃,灭菌 20 min。

## 1.2 试验方法

1.2.1 原种制备 首先选取形态正常、生长健壮、转色良好(橘红色或橙色)的野生或栽培蛹虫草子座,在超净工作台上将瓶口置于酒精灯火焰外焰处打开封口膜,用无菌镊子取尖端,在火焰旁将其放入斜面培养基中,于 25℃ 恒温条件下培养,每天观察菌丝生长情况,直至长满整个斜面,之后进行见光处理,观察转色情况,如菌苔为橘黄色或橘红色即为原种,如斜面生长不均匀,需进行纯化转接。

1.2.2 纯化转接 在超净工作台上,用无菌接种铲在酒精灯外焰处挑取斜面培养基上一小块菌种块,转接于平皿固体 PDA 培养基上,23℃ 条件下培养,观察菌丝长势,待菌丝长满整个平皿且无明显气生菌丝,经室内散射光照射,菌苔为橘黄色或橘红色的平皿,转接制备试管母种。

1.2.3 液体原种制备 将母种试管中的菌种块转接到三角瓶液体培养基中,根据斜面的大小 1 支转 3~5 瓶,每瓶接 3~5 块 1 cm<sup>2</sup> 左右的菌种块,在 22℃ 条件下避光静置培养 7~10 d,菌液澄清透明,淡黄色,且有蛹虫草独有的菌香味、无异味。

1.2.4 大米栽培种制备 使用注射器将培养的液体原种转接到大米培养基上,每瓶接种量 4~10 mL 喷洒在大米料面上。18~23℃ 条件下避光培养,观察菌丝生长情况,一般 3~5 d 菌丝会发至瓶底,菌丝以洁白浓密,无绒毛状气生菌丝、无杂菌为好,此时可置于室内进行散射光照射,培养基表面出现一些小小隆起时,可进行人工补光来增加光照,促进转色。保持培养室内通风见光时间在 10 h 以上,相对湿度控制在 60%~70%,料面上有小米粒状原基凸起(即原基分化),说明转色成功。转色后停止人工补光。

表 4

不同菌株子实体形成的比较

Table 4

Comparison among different bacterial strain cystocarps

菌株 Bacterial strain	A	B	C	D	E	F
干重 Net weight/(g·瓶 <sup>-1</sup> )	3.79	2.95	0	3.24	1.89	0
长势 Growth condition	整齐、尖头	纤细、尖头	无原基	部分畸形、尖头	畸形、圆头	不转色

## 2.3 大米培养基组成的正交实验结果

综合分析表 5 表明,最优水平组合 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 与正交实验结果中的子实体干重最大的培养基配方相符合,说明分析结果与实际试验是一致的,即蛹粉 4 g/L,葡萄糖 20 g/L,硫酸镁 2 g/L,磷酸二氢钾 1.5 g/L 为最佳蛹虫草大米培养基组合。极差分析表明,各因素影响的主次顺序是 A>B>C>D,即氮源是影响菌丝体生长的主要因素,碳源次之,磷酸二氢钾影响最小。

1.2.5 培养基优化 通过初筛和复筛选择出草整齐的“TAAAS1”菌株作为试验菌株。为确定蛹虫草大米培养基的最佳组成,以葡萄糖、蛹粉、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub> 4 个因素按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表进行设计(表 2),每 15 瓶设置为一组,每组设置 3 次重复。

表 2

正交实验设计

Table 2 Experimental design of orthogonal test

g/L

水平 Level	蛹粉 Pupa powder	葡萄糖 Dextrose	MgSO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1	4	10	1	1
2	5	20	2	1.5
3	6	30	3	2

## 2 结果与分析

### 2.1 不同菌株菌丝生长速率比较

从表 3 可以看出,菌株 D 生长速率最快,为 1.8 mm/d;菌株 B 次之为 1.7 mm/d;菌株 E 最差,仅为 1.3 mm/d。菌丝生长速率依次为 D>B>F>A>C>E。

表 3 不同菌株菌丝生长速率比较

Table 3 Comparison of growth rate of different

hyphae of bacterial strain

菌株 Bacterial strain	A	B	C	D	E	F
生长速率 Growth rate/(mm·d <sup>-1</sup> )	1.5	1.7	1.4	1.8	1.3	1.6

### 2.2 不同菌株子实体形成的比较

从表 4 可以看出,不同菌株产出表现差异明显,单瓶干重最高的为菌株 A,菌株 D 次之,均超出以往 2 g/瓶的经常性产出。

从子实体出草产出看,A>D>B>E,培养 20 d 后均有原基形成;C 培养 20 d 后菌丝基部有黄色素产生,但没有形成原基;F 菌丝呈白色,气生菌丝多,无黄色素形成。

## 3 讨论

评价蛹虫草菌株的优劣,直观判断在于出草整齐度,畸形草的出现,比如尖头长为多头,圆头长为毛刺头,甚至丛生簇状,虽然与高寒缺氧、温差大的环境因素有一定关系,但菌种的稳定性值得怀疑,经多次出草试验、多代分离菌种,长势仍然不整齐,应当淘汰重新引进适合栽培生产的菌种。菌株“TAAAS1”在 PDA(分离、保藏用培养基)生长速率没有其它菌株快,但产出稳定,

表 5 正交实验结果

Table 5 Orthogonal test results

					子实体干重 Bacterial strain cystocarp's net weight/(g·瓶 <sup>-1</sup> )
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.19
2	1	2	2	2	3.28
3	1	3	3	3	2.79
4	2	1	2	3	2.27
5	2	2	3	1	2.39
6	2	3	1	2	2.21
7	3	1	3	2	2.52
8	3	2	1	3	2.57
9	3	3	2	1	2.58
K1	8.26	6.98	6.97	7.16	
K2	6.87	8.24	8.13	8.01	
K3	7.67	7.58	7.70	7.63	
k1	2.75	2.33	2.32	2.39	
k2	2.29	2.75	2.71	2.67	
k3	2.56	2.53	2.57	2.54	
R	0.46	0.42	0.39	0.28	

整齐,应当作为首选菌株用于栽培生产;其它菌株有的生长速度快、但产出不理想,其原因是多方面的,比如菌种引进保藏时间过久、分离纯化过程中出草因子丢失、培养基 C/N 比失调、菌种退化导致不转色。

2009 年课题组最初引进的广东微生物研究所菌株也有同样表现,初期出草整齐、高产,经转管扩繁、分离纯化、提纯复壮多种措施无法恢复到最初的产出和品质。除了利用好现已改良的恒温恒湿出草实验室,控制好环境因子外,首先加强原种 F<sub>0</sub> 代分离纯化技术,其次重视菌种保藏时限、活化复壮及转管代数控制、最后在

三级菌种扩繁中注意 C/N 比对转色和出草的影响。

该试验对蛹虫草的栽培出草阶段进行了大米培养基配方优化试验,得到一个较好的配方,但由于拉萨处于 3 600 m 以上的高海拔地区,由于特殊的地理原因,在出草阶段对环境条件(湿度、温度等)的控制也是很关键的环节,从这些地方着手可能会进一步提高蛹虫草在高寒地区的产量。

参考文献

[1] 杨志超,杨姗姗. 食药用菌生产与消费指南[M]. 北京:中国农业出版社,1997:289-295.  
[2] 张甲生,马如冰,何玲,等. 蚕蛹虫草和冬虫夏草中无机元素的比较[J]. 中国食用菌,1991,10(2):43-44.  
[3] 陈千良,甘志杰,孙文基. HPLC 法测定人工蛹虫草子实体中虫草素[J]. 西北大学学报,2003,10(5):569-571.  
[4] 郭澄,朱杰,张锐,等. 高效液相色谱法测定人工虫草菌丝中腺苷和虫草素含量[J]. 中国中药杂志,1998,23(4):632-633.  
[5] 傅岚,陈作红. 虫草属真菌化学成分及药理作用研究进展[J]. 生命科学研究,2004,8(1):1-7.  
[6] 陈艳秋. 蛹虫草人工优质高产栽培技术研究[J]. 中国食用菌,2002,21(5):20-22.  
[7] KWON J S,LEE J S,SHIN W C,et al. Optimization of culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides with *Cordyceps militaris* liquid culture[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering,2009,14:756-762.  
[8] 方华舟,王小艳,向会耀. 不同氮源对蛹虫草菌丝及子实体生长状况的影响[J]. 湖北农业科学,2010,49(11):2734-2736.  
[9] 刘获. 氮源对北虫草生长的影响[J]. 吉林蔬菜,2004(3):41.

Optimization of *Cordyceps* Rice Medium at the Alpine Region

SUN Huijuan,XIE Rong,XIONG Weiping,ZHANG Junli,BAI Madanzeng,LUO Sang

(Institute of Vegetables,Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences,Lhasa,Tibet 850032)

**Abstract:**Six *Cordyceps militaris* strains introduced to Tibet were used as test materials,and were screened through comparative studies of six strains' mycelium growth rate,grass output and growing way;the optimal-level formular was screened by carrying out the orthogonal experiment design of rice medium nutrient contents. The results showed that,although hyphea growth rate of *Cordyceps* 'TAAAS1' was not the fastest,grasses coming out of *Cordyceps* 'TAAAS1' were neat and even,with a higher grass-coming output compared with other strains. It showed that 'TAAAS1'bacterial strain was a good breed suitable to be planted in an alpine region;The optimal combination of *Cordyceps militaris* rice medium was pupae powder 4 g/L,glucose 20 g/L,magnesium sulfate 2 g/L,monopotassium phosphate 1.5 g/L.

**Keywords:***Cordyceps militaris*;strain;culture medium