

北虫草菌种复壮方法的比较

王殿振¹, 贺晓龙^{1,2}, 赵瑞华^{1,2}, 任桂梅^{1,2}, 刘月芹¹

(1. 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000; 2. 陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心, 陕西 延安 716000)

摘 要:以已退化的北虫草菌种为试材, 采用孢子分离、组织分离、活体蚕蛹、基内菌丝分离、蚕蛹回接等 5 种菌种复壮法, 研究了不同复壮方法对退化菌种复壮效果的影响。结果表明: 经活体蚕蛹复壮法得到的菌种在菌丝生长速度和子实体产量均是最高, 菌丝生长速度提高了 29.97%, 子实体产量提高了 383.93%, 故确定活体蚕蛹复壮法是 5 种方法中最好的虫草菌种复壮法。

关键词:北虫草; 菌种; 复壮方法

中图分类号:S 567.3⁺9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)17-0137-03

北虫草(*Cordyceps militaris* (L.) Link) 属于囊菌亚门(Ascomycotina), 核菌纲(Pyrenomycetes), 麦角菌目

第一作者简介:王殿振(1989-), 男, 河南濮阳人, 硕士研究生, 研究方向为应用微生物及食用真菌学。E-mail: 340680760@qq.com.

责任作者:贺晓龙(1982-), 男, 陕西临潼人, 硕士研究生, 实验师, 现主要从事生物技术与食用菌等研究工作。E-mail: 254441886@qq.com.

基金项目:陕西科技厅协同创新资助项目(2015XT-34); 陕西省教育厅科研资助项目(15JK1815); 延安大学研究生教育创新资助项目。

收稿日期:2016-04-18

(Clavicipitales), 麦角菌科(Claviceptaceae), 冬虫夏草属(*Cordyceps*)的子囊真菌^[1], 又名蛹虫草、北冬虫夏草或蛹草, 与冬虫夏草同属异种, 是一大类重要的昆虫病原真菌。

研究证明, 北虫草与冬虫夏草在药化和药理上十分相似, 在功能食品、医药和生物学技术方面有较高的应用价值。药效成分主要有虫草素、腺苷、虫草酸、多糖等^[2], 有试验表明, 虫草素作为次生代谢产物具有抗菌^[3-4]、抗病毒, 干扰人体 RNA 及 DNA 合成, 显著抑制多种肿瘤生长的作用^[5]。

目前, 北虫草已实现工厂化栽培, 但由于野生菌种在人工培养基上容易丢失产生子实体的能力, 稳定性

[15] 薛卫东. 果蔬贮藏与保鲜[M]. 成都: 电子科技大学出版社, 1996: 10-11.

[16] 王海亭. 中国番茄[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2001: 171-178.

[17] 马蓉, 徐方旭, 冯叙桥, 等. 1-OCF 处理对番茄果实低温贮藏保鲜效果的影响[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(3): 231-236.

[18] CAI Z K, YANG R, XIAO H M, et al. Effect of preharvest application of *Hanseniaspora uvarum* on postharvest diseases in strawberries[J]. Postharvest Biology and Technology, 2015, 100: 52-58.

[19] 胡文忠, 姜爱丽, 杨宏, 等. 茉莉酸甲酯对鲜切苹果生理生化变化的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(16): 338-346.

Effect of White LED on Storage Quality of Postharvest Tomato

FAN Linlin, ZUO Jinhua, XIA Chunli, LYU Jiayu, GAO Lipu, WANG Qing

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Beijing Key Laboratory of Fruits and Vegetable Storage and Processing/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture/Key Laboratory of Urban Agriculture (North), Ministry of Agriculture, Beijing 100097)

Abstract: Tomato fruits were treated by white LED to determine the effect of white LED on quality and storage of tomato. The results indicated that white LED kept sensory quality, delaying the increase in weight loss, and didn't affect tomatoes' color. Moreover, white LED could inhibit degradation of TSS and vitamin C content, and enhanced POD, PPO activities with strengthening the antioxidant capacity of tomato fruits.

Keywords: LED; tomato; preservation

差,从而影响北虫草规模化的人工栽培,且有野生型菌种虫草菌素等生理活性物质含量较低的问题。因而,开展提高北虫草子实体生理活性物质含量的育种工作就显得十分的必要^[6]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为北虫草 Cs-1,由延安大学生命科学学院食用菌实验室提供;琼脂粉、葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、维生素 B₁、氢氧化钠等均为分析纯;活体柞蚕蛹购于辽宁榜式堡长林源蚕蛹合作社。

仪器设备有超净工作台(苏州智净净化设备有限公司)、压力蒸汽灭菌器(新华牌)、电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司)、气浴式振荡器(上海苏坤实业有限公司)、电子天平(SHIMADZU CORPORATION JAPAN)、优普系列超纯水机(成都超纯科技有限公司)、pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)、隔水式电热恒温培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化 将原始斜面菌种从冰箱中取出,置于室温下 24 h,再放入 22 ℃ 培养箱中培养 24 h,备用。

1.2.2 培养基的制作 斜面培养基:洋葱去皮后称 200 g,切小片,沸水煮 0.5 h,8 层纱布过滤,取滤液,加入葡萄糖 20 g,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 3 g,维生素 B₁ 10 mg,琼脂粉 20 g,待琼脂粉充分溶解后,调 pH 至 6.5,分装于试管中,在 121 ℃、0.12 MPa 压力下灭菌 30 min,完成后做无菌检验,备用。液体培养基:配方同上,不加琼脂粉即可,将 50 mL 液体培养基装入 150 mL 的三角烧瓶中,在 121 ℃、0.12 MPa 压力下灭菌 30 min,冷却后进行无菌检验,确认无菌后备用。大米培养基:大米 50 g,水 65 g,均加入到 500 mL 的虫草栽培盒中,在 121 ℃、0.12 MPa 压力下灭菌 120 min,完成后备用。

1.2.3 菌种的制备 将活化后的供试菌种转接到固体斜面培养基上记为 F₁,在 24 ℃ 的培养箱中培养^[7]9 d 左右,长满试管后进行转色处理,然后再转接到固体斜面培养基上记为 F₂,依次扩繁到 F₆,每代扩繁 7 管。并

记录每代的菌丝萌发时间(d)、日生长速度($\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$)、转色时间(d)、转色程度等生理性状,记录数据进行统计分析。

1.2.4 复壮方法 选取 F₆ 进行菌种复壮。孢子分离复壮法:选择接近成熟的子实体,悬挂于 PDA 固体培养基上,24 ℃ 培养成单个菌落,再将单个菌落移到固体斜面培养基上,布满斜面后进行转色处理,记为菌种 A;组织分离复壮法:选择形态好、长势健壮、未成熟的子实体,剪成 3~6 段,放入 0.1% 的升汞溶液中浸泡 4 s,再放入 75% 酒精中浸泡 4 s,然后用无菌水冲洗 3~5 s,用无菌滤纸吸干水,最后放入斜面上,25 ℃ 下培养至 3~5 cm,挑取菌丝尖端于新的斜面上,布满斜面后进行转色处理,记为菌种 B;活体蚕蛹复壮法:在无菌条件下将液体菌种接入蚕蛹体内,在 22 ℃ 的培养箱中避光培养,虫体僵硬后进行出草管理,子实体长到 2~3 cm 时,做组织分离,做法同组织分离复壮法。记为菌种 C;基内菌丝分离复壮法:在无菌条件下取出大米培养基中已转色的米粒,放入固体斜面培养基中,于 25 ℃ 下避光培养至菌丝长度为 3~5 cm 时,挑取菌丝尖端部分接入固体斜面培养基中,菌丝布满斜面后进行转色处理,记为菌种 D;蚕蛹回接复壮法:在无菌条件下将液体菌种接入活体柞蚕蛹体内,在 22 ℃ 的培养箱中避光培养,虫体僵硬后,取体内组织粒接到斜面上,25 ℃ 条件下避光培养,待菌丝长到 3~5 cm 后挑取菌丝尖端转接到斜面上,菌丝布满斜面后进行转色处理,记为菌种 E。

1.3 数据分析

采用 Minitab 软件对所得数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 原始虫草菌种经转代培养后的菌丝长势

从表 1 可以看出,F₁、F₂ 和 F₃ 变化不明显,F₁、F₂、F₃ 代菌种的菌丝长势明显优于 F₄、F₅、F₆ 代的,F₅ 和 F₆ 变化不明显,主要表现在菌丝日均生长量逐渐减小、转色周期逐步增加、颜色越来越淡,菌丝浓密程度越来越稀疏等方面,说明北虫草菌种传代次数不宜超过 2 次,菌丝长势与传代次数的增加呈负相关的关系。

表 1

不同繁殖代数菌种菌丝长势

扩繁代数	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆
日均生长量/($\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$)	0.516	0.511	0.496	0.463	0.425	0.417
转色周期/d	2	2	3	5	6	9
颜色	橘黄	橘黄	橘黄	黄	淡黄	淡黄
菌丝浓密程度	+++	+++	++	+	+	+

注:“+”表示菌丝浓密程度,越多表示菌丝生长越旺盛,气生菌丝越浓密。

2.2 不同北虫草复壮方法菌丝日均生长量

从表 2 可以看出,活体蚕蛹法的复壮效果最好,菌

丝日均生长量为 $0.542 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$,其后依次是蚕蛹回接法、孢子分离法和组织分离法,最差的是基内菌丝法。

表 2 不同北虫草复壮方法菌丝日均生长量

复壮方法	孢子分离	组织分离	活体蚕蛹	基内菌丝	蚕蛹回接
日均生长量/(cm·d ⁻¹)	0.514bB	0.488bB	0.542aA	0.423cC	0.529aA

注:不同小写字母表示差异达显著水平($P\leq 0.05$),不同大写字母表示差异达极显著水平($P\leq 0.01$)。

2.3 经复壮的菌种与未经复壮的菌种的生产性状比较

从表 3 可以看出,F₆ 菌种经复壮后,其生产性状有了明显的变化,满瓶天数、转色天数和出草天数较复壮前均明显缩短,产量也有了明显的增加。其中 C 菌种的生产性状最好,其次是 E 菌种和 A 菌种,较差的是 B 菌

种和 D 菌种,最差的是 F₆ 菌种。说明不同的复壮方法具有不同的效果,其中活体蚕蛹复壮法最好,蚕蛹回接复壮法和孢子分离复壮法次之,组织分离复壮法和基内菌丝复壮法较差。

表 3 经复壮的菌种与未经复壮的菌种的生产性状

菌种编号	满瓶天数/d	转色天数/d	出草天数/d	产量(鲜质量)/(g·瓶 ⁻¹)
F ₆	11	9	21	5.6
A	6	3	10	23.8
B	7	5	13	20.4
C	5	2	8	27.1
D	9	6	15	17.8
E	5	3	9	26.7

3 结论

该试验结果表明,原始菌种经扩繁 3 次以后就会出现较明显的菌种退化性状,表现为菌丝生长缓慢,转色周期变长,转色后颜色逐渐变浅,气生菌丝较多等生理性状;F₆ 代菌种经不同复壮方法复壮后,其菌丝的长势和生产性状都有了不同程度的改善,其中活体蚕蛹复壮法的复壮效果最为明显,其后依次是蚕蛹回接法、孢子分离法和组织分离法,最差的是基内菌丝法。因此,建议在生产实践中采用活体蚕蛹复壮菌种。

参考文献

[1] 于溢,安家彦. 蛹虫草胞外多糖的提取和纯化[J]. 大连轻工业学院学报,2000,19(4):268-270.

[2] 倪贺,李航海,黄文芳,等. 北虫草及其活性成分的研究与开发[J]. 科技导报,2007,25(15):75-79.
[3] SUGER A M,MCCAFFREY R P. Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine[J]. Antimicrob Agents Chemother,1998,42(6):1424-1427.
[4] AHN Y J,PARK S J,LEE S G,et al. Cordycepin:selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against clostridium SPP[J]. Agric Food Chem,2000,48:2744-2748.
[5] NAKAMURA K,YOSHIKAWA N,YAMAGUCHI Y,et al. Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation[J]. Anticancer Res,2006,26(1A):43-47.
[6] 刑来君,李明春. 普通真菌学[M]. 北京:高等教育出版社,2001:231-232.
[7] 穆忠平. 蛹虫草高产栽培技术[J]. 食用菌,2004(5):36.

Comparison of *Cordyceps militaris* Spawn Rejuvenation Method

WANG Dianzhen¹, HE Xiaolong^{1,2}, ZHAO Ruihua^{1,2}, REN Guimei^{1,2}, LIU Yueqin¹

(1. College of Life Science, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000; 2. Engineering Technology Research Center for Conservation and Utilization of Biological Resources in Shaanxi Province, Yan'an, Shaanxi 716000)

Abstract: Taking *Cordyceps militaris* as test materials, the effects of five rejuvenation methods, including the spore separation and rejuvenation, tissue isolation and rejuvenation, living silkworm rejuvenation, substrate mycelium separation and rejuvenation and silkworm chrysalis tieback rejuvenation on the rejuvenation of degraded *Cordyceps* strains were studied. The results showed that through live silkworm pupa rejuvenation of the strains in hyphal growth speed and yield of fruitbody were the highest, mycelial growth rate was increased 29.97%, fruitbody yield was increased 383.93%. So the living silkworm rejuvenation method was the best method of *Cordyceps militaris* in 5 kinds of methods.

Keywords: *Cordyceps militaris*; culture; rejuvenation