

北冬虫夏草高产菌株人工培养条件研究

贾国军, 王剑虹, 赵凤舞

(甘肃省兰州职业技术学院生物工程系, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 采用单因素试验和主要因素正交试验, 对经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子辐照选育的北冬虫夏草高产菌株 G5 的人工栽培最佳条件进行研究。结果表明, 北虫草高产菌株 G5 栽培的最佳培养基为大米 80%+蚕蛹粉 20%, 培养基料水比为 1:1.5; 菌丝和子实体生长的最佳温度分别为 23 °C 和 21 °C; 最佳散射光照强度为 500 Lx。

关键词: 北冬虫夏草; 重离子辐照; 高产菌株; 栽培条件

中图分类号: S646.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2016)11-0032-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2016.11.011

Studies on Artificial Culture Conditions of *Cordyceps militaris* High Producing Strain

JIA Guojun, WANG Jianhong, ZHAO Fengwu

(Department of Bioengineering, Lanzhou Vocational Technical College, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: The optimal conditions for artificial cultivation of high producing strain *Cordyceps militaris* G5 irradiated by heavy ion beams $^{12}\text{C}^{6+}$ are studied by single factor experiments and orthogonal test on main factors. The result shows that the optimum condition for high producing strain *C. militaris* G5 cultivation is as follows: the best mediums are both the 80% rice and 20% silkworm chrysalis; material-water ration of the medium is 1:1.5; the optimum temperature is 23 °C for proliferating mycelia and 21 °C for fruiting bodies growth; and the best lighting intensity is 500 Lx.

Key words: *Cordyceps militaris*; Heavy-ion irradiation; High producing strain; Cultivation conditions

北冬虫夏草 [*Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link.] 又称北虫草, 蛹虫草, 隶属于真菌界、子囊菌门、子囊菌纲、肉座菌目、麦角菌科、虫草属^[1-2], 与冬虫夏草是同属不同种, 也是一种久负盛名的药用真菌, 可全草入药, 具特殊的药用价值和滋补功效, 含有虫草素、虫草酸、虫草多糖、SOD、和微量元素硒等多种生物活性物质^[3], 可促进机体新陈代谢, 提高机体的免疫功能^[4]。古人就有“宁要虫草一把, 不要黄金满车”之说。北虫草所含营养成分的种类、数量与冬虫夏草相同或基本相同, 且在某些营养物质的含量上高于冬虫夏草^[5]。近年来, 我国关于北虫草人工栽培及规模化生产技术已有很多报道, 但是还存在影响北虫草子实体人工培养和工业化生产规模扩大的若干关键的、急需解决的问题, 比如说菌种的退化问题、菌种的选育研究、不同地区培养条件的优化研究, 以及如何提高子实体的生物产量等问题^[6-7]。为此, 我们对经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子辐照选育出的北冬虫

夏草高产菌株 G5 的人工栽培培养基与培养条件进行了探索研究, 旨在筛选出北虫草诱变菌株的最佳人工栽培培养基与培养条件, 为北虫草产业化、工业化生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株北虫草高产菌株 G5 (保藏于兰州职业技术学院生物工程系微生物实验室), 为兰州职业技术学院生物工程系微生物实验室和中国科学院近代物理研究所兰州重离子加速器国家实验室通过 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子辐照诱变所得。

1.2 仪器设备

500 mL 培养瓶、聚丙烯薄膜、SW-CJ-2D 型超净工作台、LDZX-50KBS 型立式灭菌锅、AL204 型电子天平、THZ-300 型恒温摇床培养箱、ZRD-7080 全自动新型恒温鼓风干燥箱、PHS-2F 精密酸度计、250-D 数显光照培养箱、SPX 智能型光照培养箱、DW-86L632 超低温冰箱、SP5000 移液器。

收稿日期: 2016-07-20

基金项目: 兰州市人才创新创业项目“几种食(药)用微生物重离子辐照诱变育种及应用”(2015-RC-21); 甘肃省教育厅项目“循环农业模式下几种食用菌栽培关键技术研究及推广”(2015A-207)部分内容。

作者简介: 贾国军(1986—), 男, 甘肃天水人, 助教, 硕士, 主要从事食品微生物与食药菌领域的教学、科研及技术推广工作。联系电话: (0)15002585838。E-mail: welljgj@126.com。

1.3 营养液配制

2.5% 葡萄糖、1.0% 蛋白胨、0.2% $MgSO_4$ 、0.2% KH_2PO_4 、 V_{B1} 微量, pH 调制中性。

1.4 北虫草液体菌种制备

培养基配方为: 葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 $MgSO_4$ 1 g、 V_{B1} 100 μg 、水 1 000 mL, pH 调制中性, 制备方法详见谢春芹等^[4]。

1.5 培养基筛选

栽培培养基共 6 种, ①大米培养基, 优质大米 35 g, 营养液 45 mL; ②大米+蚕蛹粉培养基, 优质大米 28 g(占80%), 蚕蛹粉 7 g(占20%), 营养液 45 mL; ③小麦培养基, 优质小麦 35 g, 营养液 45 mL; ④小麦+蚕蛹粉培养基, 优质小麦 28 g, 蚕蛹粉 7 g, 营养液 45 mL; ⑤小米培养基, 优质小米 35 g, 营养液 45 mL; ⑥小米+蚕蛹粉培养基, 优质小米 28 g, 蚕蛹粉 7 g, 营养液 45 mL。

1.6 栽培方法

在 500 mL 培养瓶中, 每瓶约装 35 g 培养料, 加入 45 mL 的营养液, 瓶口包扎聚丙烯薄膜, 高压 121 $^{\circ}C$ 灭菌 30 min 或者常压 100 $^{\circ}C$ 保持 8 h。灭菌后, 培养瓶内的饭粒不生也不成糊状, 饭粒之间有空隙。冷却后在无菌操作台上, 每瓶接入制作好的液体菌种 4~5 mL, 用专门的喷雾接种枪进行接种^[4]。于 20~23 $^{\circ}C$, 避光黑暗培养至菌丝布满整个瓶面并扎到底部, 开始见光, 菌丝转变成桔黄色时, 18~22 $^{\circ}C$ 室内散射光照培养, 保持湿度为 70%~80%。子实体成熟时采收, 干燥, 称重, 计算平均产量。

1.7 培养条件筛选

1.7.1 培养基料水比 培养基选择大米+蚕蛹粉, 料水比(固体基质/营养液体积比)设 1.5 : 1, 1 : 1, 1 : 1.5, 1 : 2.3, 1 : 4, 1 : 9, 按照 1.5 的栽培方法进行人工培养。

1.7.2 菌丝培养温度 在菌丝生长时期, 将温度设定为 17、19、21、23、25、27 $^{\circ}C$, 按照 1.5 的栽培方法进行人工培养。

1.7.3 子实体培养温度 在子实体生长时期, 将温度设定为 17、19、21、23、25、27 $^{\circ}C$, 按照 1.5 的栽培方法进行人工培养。

1.7.4 光照强度 采用不同密度的遮阳网设置不同的光照强度, 将黑暗发菌至瓶底转色的栽培瓶, 置于不同光照下培养。光照强度分别设定日光灯连续照射为 100、500、2 500 Lx, 散射光间隔照射为 300、500、2 500 Lx。

1.8 栽培因子正交试验

选取影响北虫草子实体生长的 4 个主要因素,

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 考察培养基、培养基料水比、子实体培养温度和光照强度对北虫草子实体产量的影响见表 1。共进行 9 组试验, 每组试验 20 瓶。

表 1 北虫草人工栽培条件正交试验设计

水平	培养基	培养基料水比	子实体培养温度/ $^{\circ}C$	散射光照强度/ L_x
1	小米+蚕蛹粉	1 : 1	19	300
2	大米	1 : 1.5	21	500
3	大米+蚕蛹粉	1 : 2.3	23	2 500

2 结果与分析

2.1 培养基类型筛选

从表 2 可知, 北虫草高产菌株 G5 在大米培养基、大米 + 蚕蛹粉培养基上菌丝体发育周期短, 小米培养基、小米 + 蚕蛹粉培养基次之, 小麦培养基、小麦 + 蚕蛹粉培养基周期最长。子实体质量大米培养基和 大米 + 蚕蛹粉培养基所产子实体明显优于其他原料。从子实体产量看, 单一原料以大米培养基为最好, 平均每瓶产干子实体 7.85 g; 复合原料以大米 + 蚕蛹粉培养基子实体产量最高, 平均每瓶产子实体产量为 8.12 g。通过试验确定, 大米 + 蚕蛹粉培养基为最佳的固体培养基, 其次为大米培养基。

表 2 不同培养基类型对北虫草生长的影响^①

培养基	菌丝体发育周期/d	子实体质量评价	子实体产量/(g/瓶)
大米	27	+++	7.85
大米+蚕蛹粉	25	+++	8.12
小麦	34	+	5.57
小麦+蚕蛹粉	31	+	6.23
小米	30	+	6.77
小米+蚕蛹粉	30	++	7.42

① “+++”表示子实体粗壮整齐, 平均直径在 5 mm 以上, 平均长度在 8 cm 以上; “++”表示子实体较整齐, 平均直径在 4 mm 以上, 平均长度在 6 cm 以上; “+”表示子实体长势不整齐, 平均直径在 2 mm 以上, 平均长度在 4 cm 以上; “-”表示子实体长势稀疏, 平均直径在 2 mm 以下, 平均长度在 4 cm 以下; “--”表示不出苗。下表同。

2.2 培养基料水比对北虫草高产菌株 G5 生长的影响

从表 3 可知, 培养基料水比为 1 : 1.5 时子实体质量较好, 平均每瓶产量达 8.05 g; 料水比高于 1 : 4 时基本不形成子实体。

表 3 不同培养基料水比对北虫草生长的影响

料水比	子实体质量评价	子实体产量/(g/瓶)
1.5 : 1	+	6.06
1 : 1	++	7.87
1 : 1.5	+++	8.05
1 : 2.3	+	7.19
1 : 4	-	1.63
1 : 9	--	

2.3 不同菌丝培养温度对北虫草高产菌株 G5 生长的影响

从表 4 可知, 菌丝培养温度对虫草的产量和质量影响较小, 在 17~27℃ 范围均可出草。其中在 23℃ 时培养的北虫草菌株 G5 子实体长势质量最好, 平均每瓶产量达 8.18 g。

表 4 不同菌丝培养温度对北虫草生长的影响

菌丝培养温度 /℃	子实体质量评价	子实体产量 / (g/瓶)
17	++	6.61
19	+++	7.44
21	+++	7.98
23	+++	8.18
25	++	5.90
27	+	4.87

2.4 不同子实体培养温度对北虫草高产菌株 G5 生长的影响

从表 5 可知, 子实体培养温度在 17~23℃ 范围时, 对北虫草菌株 G5 的产量和质量影响较大, 21℃ 是最适培养温度, 此时产量最高, 平均每瓶产量达 8.13 g。培养温度超过 23℃ 时, 子实体质量相对较差, 产量低。

表 5 不同子实体培养温度对北虫草生长的影响

菌丝培养温度 /℃	子实体质量评价	子实体产量 / (g/瓶)
17	++	7.55
19	+++	7.91
21	+++	8.13
23	++	7.29
25	+	6.22
27	+	3.96

2.5 不同光照强度对北虫草高产菌株 G5 生长的影响

从表 6 可知, 黑暗处理的菌株不产生子实体, 日光灯连续光照与散射光间隔光照均能产生子实体。500 Lx 光照处理的子实体质量较好^[8], 尤其是在 500 Lx 的散射光间隔光照下子实体生长最好, 产量达 8.11 g/瓶。可见, 500 Lx 的散射间隔光照处理为最佳光照条件。

表 6 不同光照强度对北虫草生长的影响

光照处理	光照强度 /Lx	子实体质量评价	子实体产量 / (g/瓶)
黑暗		--	0
日光灯连续照射	100	+	2.94
	500	+++	7.54
	2 500	+	3.65
散射光间隔照射	300	+++	5.42
	500	+++	8.11
	2 500	++	7.16

2.6 栽培条件的正交试验结果

从正交试验结果(表 7)可知, 人工培养北虫草栽培条件的最优组合是: 培养基为大米 + 蚕蛹粉, 子实体培养温度为 21℃, 散射光照度为 500 Lx, 培养基料水比 1:1.5。影响北虫草高产菌株 G5 生长因素的主次顺序为培养基类型>子实体培养温度>光照强度>培养基料水比。其中, 培养基的极差最大, 是影响栽培的关键性因素。

表 7 北虫草人工栽培条件正交试验结果

试验号	培养基	料水比	子实体培养温度 /℃	散射光照强度 /Lx	子实体产量 / (g/瓶)
1	1	1	1	1	5.32
2	1	2	2	2	6.89
3	1	3	3	3	6.01
4	2	1	2	3	7.79
5	2	2	3	1	8.03
6	2	3	1	2	7.48
7	3	1	3	2	8.16
8	3	2	1	3	7.65
9	3	3	2	1	7.81
K1	18.22	21.27	20.45	21.16	
K2	23.30	22.57	22.49	22.53	
K3	23.62	21.30	22.20	21.45	
k1	6.07	7.09	6.82	7.05	
k2	7.77	7.52	7.50	7.51	
k3	7.87	7.10	7.40	7.15	
R	5.40	1.30	2.04	1.37	
	A3	B2	C2	D2	

3 小结与讨论

北冬虫夏草生理独特, 生态复杂, 是鳞翅目昆虫的蛹体感染虫草菌后形成的虫与真菌两部分组成的复合体, 主要生长在针叶林、阔叶林或混交林地表土层中。北虫草自然资源分布数量很少, 价格昂贵, 仅靠野生虫草已无法满足市场的需求, 且采挖野生虫草, 破坏植被, 水土流失严重。人工栽培的北虫草作为野生虫草的替代品, 市场空间大, 效益高^[9]。人工培养蛹虫草子实体影响因子很多, 也很复杂, 优良菌种的选育和高产培养条件的研究仍是北虫草研究的重点^[10]。

目前, 国内外已有研究者通过离子注入微生物, 成功获得目标性能大幅度提高、遗传性稳定的菌株^[11], 而¹²C⁶⁺重离子在兰州重离子研究装置(HIRFL)上加速以后, 具有能量高、生物效应高等传统诱变手段不具备的独特优势^[12]。本研究所用北虫草高产菌株 G5 是利用¹²C⁶⁺重离子辐照处理所产生诱变菌株, 是值得人工栽培、研究开发和推广的好品种, 为北虫草的产业化提供优质资源。

本试验通过单因素试验法及主要因素正交试验, 对北冬虫夏草高产菌株 G5 的人工栽培培养基

天水城市园林植物真菌病害调查初报

汤春梅¹, 杨庆森²

(1. 甘肃林业职业技术学院, 甘肃 天水 741020; 2. 甘肃省小陇山林业实验局林业有害生物防治检疫站, 甘肃 天水 741020)

摘要: 2014—2016年对天水城市园林植物真菌病害进行了调查。结果发现, 危害天水市园林植物的真菌病害有12类39种, 其中发生较严重的病害有月季白粉病、大叶黄杨白粉病、海棠锈病、月季黑斑病、合欢枯萎病、大叶黄杨炭疽病、金叶女贞褐斑病、侧柏叶枯病、樱花褐斑穿孔病, 并对上述病害的症状、病原作了描述。

关键词: 园林植物; 真菌病害; 种类; 调查; 天水

中图分类号: S432.44

文献标志码: A

文章编号: 1001-1463(2016)11-0035-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2016.11.012

近年来, 随着天水城市框架的不断延伸, 城市绿化面积也在逐年增加, 高标准、高质量的园林绿地逐渐进入了人们的生活, 既美化了环境, 又为人们提供了良好的生活环境。但是, 随着绿地面积和园林植物品种的大幅度增加, 以及园林

植物种植结构的大范围调整, 病害日趋加重, 导致一些园林植物大量枯死, 已成为巩固绿化成果的重要瓶颈^[1]。我们对天水城市园林植物真菌病害进行了初步调查和鉴定, 以便为了解该区内主要病害的发生特点, 以及病害防治提供参考。

收稿日期: 2016-09-27

基金项目: 2014年天水市科技局项目“天水城市园林植物主要有害生物无公害防治技术研究”。

作者简介: 汤春梅(1977—), 女, 甘肃永登人, 副教授, 硕士, 主要从事林业有害生物防治及昆虫专业的教学与研究工作。联系电话: (0)13893824355。

与培养条件进行探索, 获得了最佳人工栽培培养基与培养条件: 培养基为大米 80%+ 蚕蛹粉 20%, 培养基料水比 1:1.5, 子实体培养温度为 21℃, 散射光照度为 500 Lx。北冬虫夏草的种类多、分布广, 不同地域不同品种培养条件存在差异^[13-15]。本研究结果可供其他北冬虫夏草人工栽培参考, 也可为北虫草产业化开发和工业化生产提供一定的技术支持。

参考文献:

- [1] 梁宗琦. 中国真菌志·虫草属[M]. 32卷. 北京: 科学出版社, 2007: 1-4; 32-39.
- [2] 邵力平. 真菌分类学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1984: 89-113.
- [3] 罗信昌. 冬虫夏草研究进展[J]. 中国食用菌, 1994, 13(4): 3-5.
- [4] 谢春芹, 赵桂华, 冯大俊, 等. 蛹虫草人工培养条件的研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2011, 42(3): 345-348.
- [5] 常明昌. 食用菌栽培[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 233-238.
- [6] 王建芳. 蛹虫草优良菌株筛选与高产技术研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006: 7-8.
- [7] 范志微. 蛹虫草优良菌株的筛选及其营养特性的分析

[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013: 2-3.

- [8] 孟繁宇. 蛹虫草高产菌株人工栽培条件的优化[J]. 食用菌, 2009, 31(4): 55-56.
- [9] 张绪璋. 北虫草新菌株选育及栽培技术研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(19): 206-210.
- [10] 郑壮丽, 黄春花, 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.
- [11] 陈积红, 王曙阳, 刘敬重, 等. 离子辐照阿维菌素产生菌的诱变选育[J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 45(3): 85-87.
- [12] 肖国青, 宋明涛, 李文建, 等. 中国科学院近代物理研究所重离子辐照生物研究平台[J]. 原子核物理评论, 2008, 25(2): 161-164.
- [13] 张 姝, 张永杰, SHRESTHA BHUSHAN, 等. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望[J]. 菌物学报, 2013, 32(4): 577-597.
- [14] 王 忠, 马启龙, 乔正强, 等. 冬虫夏草全人工培养感染试验结果[J]. 甘肃农业科技, 2001(7): 40-41.
- [15] 王 忠, 马启龙, 乔正强. 甘肃冬虫夏草菌分离培养研究[J]. 甘肃农业科技, 2001(7): 43-44.

(本文责编: 杨 杰)