

广东虫草人工栽培的光温条件研究

林群英, 李泰辉, 黄浩, 宋斌

(广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070)

摘要:以自行分离的广东虫草 *Cordyceps guangdongensis* 菌种为材料, 对其子实体栽培所需的温度和光照条件进行了研究. 单因素试验结果表明: 广东虫草菌丝的最佳生长温度为 23 °C, 原基形成的最佳温度范围为 20 ~ 23 °C, 子实体生长的最佳温度为 23 °C; 光照度为 800 ~ 1 000 lx 时, 最利于原基的诱导形成, 但对子实体的生长有抑制作用, 生物转化率为 7.87% (按子实体干质量计算), 光照度低于 400 lx 时, 子实体生长良好, 生物转化率高于 9.0%.

关键词: 虫草属; 子实体栽培; 光照; 温度

中图分类号: Q939.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)01-0042-04

Studies on Light and Temperature Conditions for Cultivation of *Cordyceps guangdongensis*

LIN Qun-ying, LI Tai-hui, HUANG Hao, SONG Bin

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China)

Abstract: The temperature and light conditions for fruitbody cultivation of *Cordyceps guangdongensis* were optimized. The single-factor experiments indicated that the optimum temperatures for mycelium growth, primordial formation and fruitbody growth were 23, 20 - 23, 23 °C, respectively. The illuminance of 800 - 1 000 lx was the optimal condition for primordial formation, but it suppressed the growth of fruitbody, with bioefficiency of 7.87% (Calculated from dry mass of fruitbodies). Fruitbodies grew well under the illuminance below 400 lx, with bioefficiency higher than 9.0%.

Key words: *Cordyceps*; fruitbody cultivation; light; temperature

世界范围内已发现虫草属 *Cordyceps* 真菌有 450 多种, 国内已报道的超过 100 种, 广东地区则发现了 30 多种^[1-2]. 已有资料表明, 许多虫草属真菌富含多种氨基酸、微量元素和维生素等营养成分, 以及腺苷、虫草素、虫草酸等活性成分, 具有抗肿瘤、抗病原、抗氧化以及增强人体免疫力等多种药理功能^[3-5], 因此, 开发利用虫草属真菌资源具有十分重要的意义. 子实体的人工栽培是虫草资源开发利用的重要途径. 由于子实体形成和生长所需的条件不明确或难以满足, 导致许多虫草无法进行大量的人工栽培. 因此, 研究不同虫草的子实体形成条件及其

影响因子, 是虫草产业化技术的关键. 至今, 仅有蛹虫草 *C. militaris* 实现了规模化生产, 其他如冬虫夏草 *C. sinensis*、古尼虫草 *C. gunnii* (Berk.) Berk. 和蝉花虫草 *C. sobolifera* (Hill ex Watson) Berk. et Broome 等尚处于试验研究阶段^[6-8]. 广东虫草 *Cordyceps guangdongensis* T. H. Li, Q. Y. Lin & B. Song 是目前仅发现于广东地区的一种虫草新资源^[9], 鲜见人工培养的报道. 前期的试验表明, 该虫草可以实现子实体的人工培养. 为进一步明确其人工栽培特性, 本文针对其子实体形成和生长要求的温度和光照条件进行了专门研究.

收稿日期: 2008-04-22

作者简介: 林群英 (1979—), 女, 博士; 通讯作者: 李泰辉 (1959—), 男, 研究员, 博士, E-mail: mycolab@263.net

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (E05202480); 广东省科技计划项目 (2005B33302005, 2006B20201042); 广州市科技项目 (2007Z3-E0511); 广东省粤港招标项目 (2007168604); 东莞市科技项目 (东科[2007]1号)

1 材料与方 法

1.1 试验材料

广东虫草 *Cordyceps guangdongensis*: 由广东省微生物研究所微生物资源中心实验室分离获得, 于豆芽汁 PDA 培养基上培养、保存。

豆芽汁 PDA 培养基: 豆芽 100 g/L, 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 6.0。

液体培养基: 葡萄糖 10 g/L、麦芽浸出物 3 g/L、蛋白胨 5 g/L、酵母浸膏 3 g/L, pH 6.0。装入 500 mL 的三角瓶, 每瓶 250 mL, 121 °C 灭菌 15 min。

米饭培养基: 大米 20 g, 营养液(配方同液体培养基)25 mL, 装入组培瓶(容量为 250 mL, 12 cm × 6.5 cm × 6.5 cm)中, 121 °C 灭菌 40 min。

1.2 液体菌种的准备

取预先培养的斜面菌块(直径约 0.4 ~ 0.5 cm) 10 块, 接入液体培养基中, 25 °C 140 r/min 振荡培养 10 d, 至菌球长满全部液体培养基, 备用。

1.3 温度影响

1.3.1 温度对菌丝生长的影响 将菌龄和大小相同的菌种块, 接入豆芽汁 PDA 斜面试管中, 分别于 17、23、28 和 32 °C 下培养 14 d 后, 再将生长的菌落置于光照度为 400 ~ 500 lx 的光照下(每天 10 h)诱导原基形成。记录各温度下菌种块的萌发时间, 测量菌落直径, 计算菌丝生长速度, 并记录原基形成数量。各处理均设 5 个重复(下同)。

1.3.2 温度对原基形成的影响 将液体菌种按每瓶 15 mL 接入米饭培养基中, 分别于 20、23、25 和 28 °C 下避光培养 8 d 后, 移至光照度为 400 ~ 500 lx 下进行光照培养(每天 10 h), 诱导原基形成, 观察比较各处理原基的形成数量。

1.3.3 温度对子实体生长的影响 将液体菌种按每瓶 15 mL 接入米饭培养基中, 于 23 °C 下培养并诱导原基产生。待原基长至 2 ~ 3 cm 的子实体时, 再分别置于 20、23、25 和 28 °C 下(光照条件为 400 ~ 500 lx, 每天 10 h)培养 30 d。测量各处理子实体的高度和直径, 称量子实体的鲜质量和干质量(子实体干质量在 60 °C、4 h 烘干后, 称量, 此时干子实体的水分含量为 2.84%), 并计算生物转化率[生物转化率 = (子实体干质量/培养基干物质) × 100%]。

1.4 光照的影响

1.4.1 光照起始时间对子实体原基形成的影响 将液体菌种按每瓶 15 mL 接入米饭培养基中, 23 °C, 分别避光培养 8、10、12 和 14 d 后, 进行光照培养(400 ~ 500 lx, 每天 10 h)。观察菌丝转色和原基形成情况。

1.4.2 光照度对子实体原基形成的影响 将液体菌种按每瓶 15 mL 接入米饭培养基中, 23 °C, 避光培养 8 d 后, 分别以 100 ~ 200、300 ~ 400、400 ~ 500 和 800 ~ 1 000 lx 的光照度进行光诱导培养 14 d(每天光照 10 h), 观察记录原基形成情况。

1.4.3 光照度对子实体生长的影响 将预先培养的子实体(高度 2 ~ 3 cm) 分别在 100 ~ 200、300 ~ 400、400 ~ 500 和 800 ~ 1 000 lx 的光照下培养(每天 10 h), 比较不同光照度下的子实体形态和生物转化率。

1.5 数据分析

所有数据用 Excel 2003 和 SPSS 15.0 进行处理, 以 LSD 多重比较法进行数据间显著性分析。

2 结果与分析

2.1 温度对菌丝、原基形成和子实体生长的影响

2.1.1 不同温度对菌丝生长和原基形成的影响

从表 1 可知, 较高的温度利于菌种块萌发, 28 和 32 °C 下, 接种后 3 d 即可见到新生菌丝形成, 而在 17 °C 下, 则需 6 d 才能形成新生菌丝。28 °C 下最适合菌丝的生长, 培养 14 d 后, 菌落直径达 2.72 cm, 23 °C 次之, 菌落直径为 2.62 cm, 两者无显著性差异。17 和 32 °C 下, 菌丝生长缓慢, 培养 14 d 后, 菌落直径仅为 1.58 和 1.30 cm, 显著低于 23 和 28 °C 处理。另外, 32 °C 培养无原基形成, 说明温度高不利于原基形成, 28 °C 有少量原基形成, 17 和 23 °C 的原基形成数量最多。

表 1 温度对广东虫草菌丝生长和原基形成的影响

Tab. 1 Effects of temperature on hyphal growth and primordium formation of *Cordyceps guangdongensis*

$\theta/^\circ\text{C}$	$t_{\text{萌发}}/\text{d}$	$d_{\text{菌落}}^{1)}/\text{cm}$	原基数量 ²⁾
17	6	1.58 ± 0.20a	+++
23	4	2.62 ± 0.32b	+++
28	3	2.72 ± 0.30b	+
32	3	1.30 ± 0.14a	-

1) 菌落直径为培养 14 d 后的结果, 本列数据后标有相同字母表示不具显著性差异($P=0.05$); 2) “+++”表示原基形成的数量较多, “+”表示原基形成的数量较少, “-”表示无原基。

2.1.2 不同温度对原基形成的影响 20 和 23 °C 下, 虫草菌丝培养 8 d 后光照处理, 均能够形成原基, 原基数量相当。25 °C 下, 原基则无法正常形成, 表现为气生菌丝生长过于旺盛, 转色不好, 后期有少许绿色团状原基形成, 但无法正常生长。28 °C 下无原基形成(表 2)。

2.1.3 不同温度对子实体生长的影响 子实体在

20、23 和 25 °C 下均能正常生长,其中以 23 °C 下的产量最高,每瓶干质量达 3.52 g,生物转化率为 17.59%。28 °C 下,子实体生长受到抑制,在顶端能产生气生菌丝。各温度下的子实体直径,以 20 °C 处理最大,为 2.60 mm,23 °C 次之,为 2.56 mm,25 °C 最小,为 1.81 cm,后者与前两者有显著性差异。各温度下的子实体高度,以 25 °C 最大,平均高度达 3.63 cm,23 °C 次之,20 °C 最小,但三者之间无显著性差异(表 2)。

表 2 温度对广东虫草原基形成和子实体生长的影响¹⁾

Tab. 2 Effects of temperature on primordium formation and fruitbody growth of *Cordyceps guangdongensis*

$\theta/^\circ\text{C}$	原基数量 ²⁾	子实体			生物转化率/%
		$m_{\text{干}}/\text{g}$	d/mm	h/cm	
20	+++	$3.32 \pm 0.45\text{a}$	$2.60 \pm 0.26\text{a}$	$3.08 \pm 0.62\text{a}$	16.60
23	+++	$3.52 \pm 0.53\text{a}$	$2.56 \pm 0.42\text{a}$	$3.13 \pm 0.44\text{a}$	17.59
25	-	$2.93 \pm 0.56\text{b}$	$1.81 \pm 0.46\text{b}$	$3.63 \pm 0.64\text{a}$	14.65

1) 28 °C 下,子实体不生长,数据未列在表中;2) “+++”表示原基形成的数量较多,“+”表示原基形成的数量较少,“-”表示无原基

2.2 光照的影响

2.2.1 起始光照诱导时间对原基形成的影响 菌丝生长 8 d 后,光照处理 4 d,菌丝开始转色,继续光照 3 d,原基开始形成。菌丝生长 10 d 后,进行同样的光照处理,4 d 后菌丝转色,继续光照 6 d,原基产生。菌丝生长 12 d 后,进行光照,原基形成情况与菌丝生长 10 d 的处理相同。菌丝生长 14 d 后,菌丝已经完全侵占培养基,表面的气生菌丝较旺盛,此时进行光照处理,8 d 后气生菌丝生长受抑制,并出现转色现象,继续光照 8 d,才开始形成原基。各处理的原基形成数量,以菌丝生长 14 d 的最低,显著少于其他处理。可见,菌丝生长 8 d 是最佳的起始光照诱导时间。

2.2.2 不同光照度对原基形成的影响 从表 3 可知,800 ~ 1 000 lx 的光照度诱导,菌丝转色最快(3 d),原基出现最早(3 d),且原基数量最多。而 400 ~ 500 lx 的光照度下,原基形成情况与 800 ~ 1 000 lx 下的相似,但原基数量减少。100 ~ 200 lx 的光照度下,原基形成情况最差,表现为形成时间迟,比 800 ~ 1 000 lx 下的晚 2 d,且数量最少。

表 3 光照度对广东虫草子实体原基形成的影响

Tab. 3 Effect of illuminance on primordium formation of *Cordyceps guangdongensis*

E/lx	$t_{\text{转色}}/\text{d}$	$t_{\text{原基形成}}/\text{d}$	原基数量 ¹⁾
100 ~ 200	8	5	+
300 ~ 400	6	5	++
400 ~ 500	4	3	+++
800 ~ 1 000	3	3	++++

1) + 越多表示原基形成的数量越多

2.2.3 光照度对子实体生长的影响 从表 4 可知,光照越强,子实体生长速度越慢,颜色越深。光照度为 1 000 lx 时,子实体的平均高度仅 3.64 cm,显著低于较弱光照下培养的子实体。同时,子实体在近乎无光照(10 lx)的情况下可以正常生长,比一些强光照(800、1 000 lx)的情况都好,而且气生菌丝不会重新生长而导致营养耗损。子实体在生长阶段,并不需要光照,强度高的光照反而会抑制子实体的生长,并加深子实体的颜色,促使子实体加快老化(图 1)。

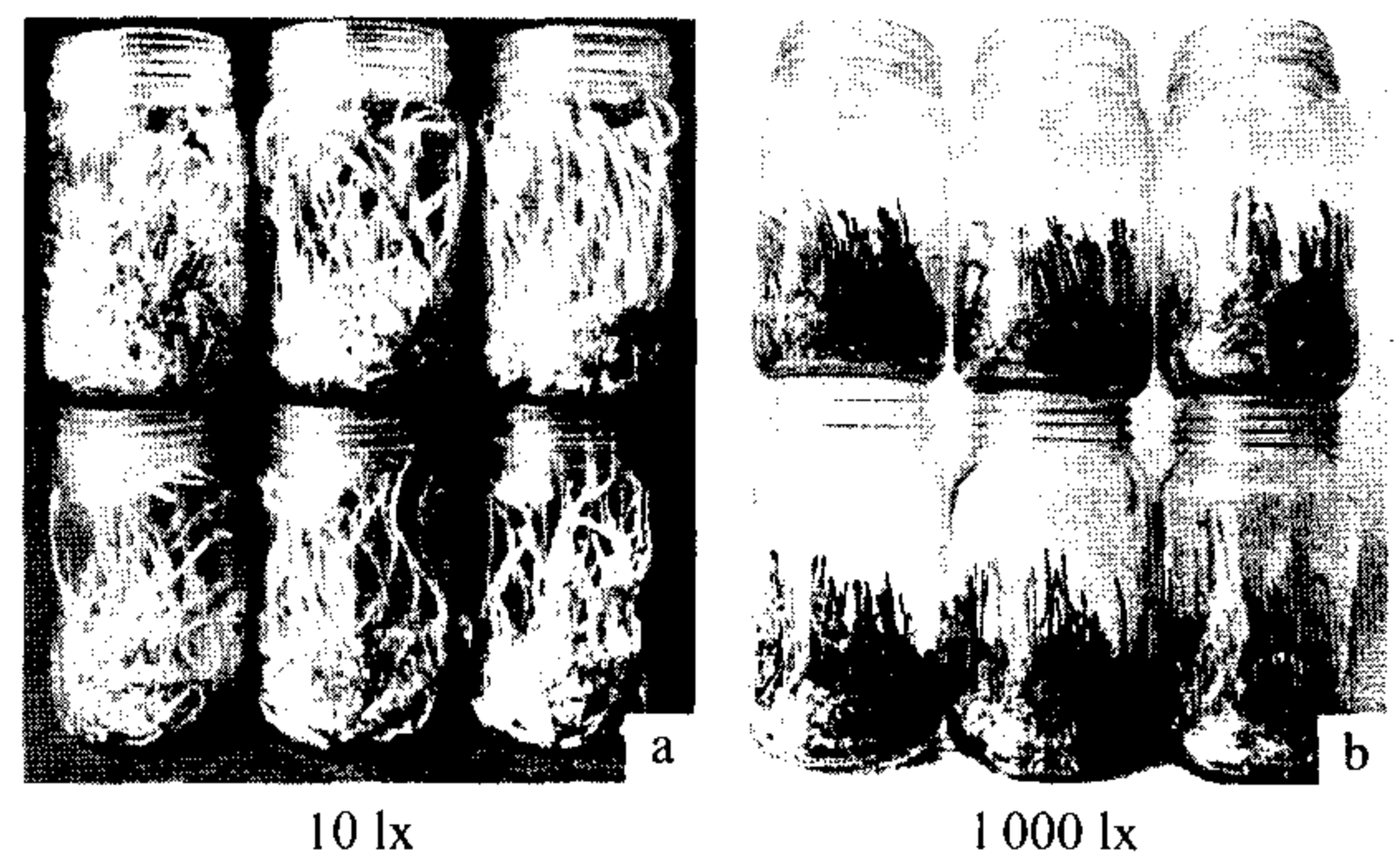


图 1 2 种光照度下生长的广东虫草子实体

Fig. 1 Fruitbodies of *Cordyceps guangdongensis* growing under two different light densities

表 4 光照度对广东虫草子实体生长的影响¹⁾

Tab. 4 Effect of illuminance on fruitbody growth of *Cordyceps guangdongensis*

E/lx	$m_{\text{鲜}}/\text{g}$	$m_{\text{干}}/\text{g}$	生物转化率/%	h/cm	子实体颜色
10	$8.73 \pm 0.64\text{a}$	$1.85 \pm 0.12\text{a}$	9.25	$5.90 \pm 0.55\text{a}$	黄
100	$8.98 \pm 0.59\text{a}$	$1.86 \pm 0.24\text{a}$	9.28	$5.91 \pm 0.85\text{a}$	黄绿
400	$8.03 \pm 0.52\text{a}$	$1.84 \pm 0.16\text{a}$	9.18	$5.55 \pm 0.67\text{a}$	黄绿
800	$5.19 \pm 0.19\text{b}$	$1.57 \pm 0.06\text{b}$	7.87	$4.56 \pm 0.55\text{b}$	墨绿
1 000	$5.55 \pm 0.65\text{b}$	$1.55 \pm 0.29\text{b}$	7.73	$3.64 \pm 0.42\text{c}$	墨绿

1) 同列数据后标有相同字母者表示差异不显著($P = 0.05$)

3 讨论

在不同温度下,斜面培养基上生长的菌丝状态差异较大,尤其是原基的形成情况与米饭培养基上生长的菌丝相似。一旦温度高于 25 °C,广东虫草则无法正常形成原基,而子实体则可以在 25 °C 下正常生长。在 20 ~ 22 °C 时,蛹虫草子座易形成,26 ~ 30 °C 下,仅有少量子座形成^[10]。可见,原基的分化一般较菌丝和子实体的生长温度低些。原基能否正常形成是人工栽培子实体的关键环节,因而,必须在原基发生阶段严格控制好培养温度。

在 20 ~ 25 °C 下,广东虫草子实体生长正常,23 °C 下生长最好;28 °C 下,子实体生长受到抑制,但

并未导致其死亡,一旦温度回复至 25 ℃ 或以下,子实体在其他部位萌发出新的生长点,继续生长,但生长速度受到一定影响.因而,在进行人工栽培时,需要避免温度过高,以免影响子实体的质量.人工栽培时的子实体生长温度应与自然生长环境相一致.野生的广东虫草采集自广东省内,生长时期是4月中下旬至6月,采集时测得的气温为 22 ~ 25 ℃.此外,广东虫草与其他虫草和食用菌对温度的要求相近.蛹虫草子实体的生长温度在 20 ℃ 左右,不可高于 30 ℃^[11-12],古尼虫草在室温(9 ~ 23 ℃)下成功形成子实体^[7].其他食用菌如金针菇和香菇等的子实体生长温度也在 20 ~ 22 ℃.Yamanaka 等^[13]和吴云鹤等^[14]认为温差对虫草子实体原基的形成有明显的促进作用,而温差对广东虫草子实体的形成是否也有相似的作用,则需要进一步的研究.

光照是诱导食用菌原基形成和促进子实体生长的重要条件.蛹虫草必须在光照条件下,才能转色和形成子实体原基.蝉花的无性型蝉拟青霉 *Paecilomyces cicadae* 必须在光照的条件下才能产生孢梗束和分生孢子,暗培养下则无法形成^[15].与蝉拟青霉相似,广东虫草原基的形成也必须要强光的诱导.不同研究报道的蛹虫草子实体生长合适光照度各有不同,500 ~ 1 000 lx 均有报道^[16-17],但总的来说,均高于 500 lx.一旦原基形成,进入子实体生长阶段,广东虫草与蛹虫草对光照的要求出现较大的差异,而与高雄山虫草 *C. takaomontana* Yakushiji & Kumazawa 的无性型细脚拟青霉 *P. tenuipes* (Peck) Samson 较为相似^[18].在高于 400 lx 时,光照度越高,对广东虫草子实体的抑制作用越明显,越加速子实体的老化,使子实体的颜色越深,颜色可由嫩黄色变成墨绿色.

参考文献:

- [1] STENSRUD O, HYWEL-JONES N L, SCHUMACHER T. Towards a phylogenetic classification of *Cordyceps*: ITS nrDNA sequence data confirm divergent lineages and paraphyly [J]. Mycol Res, 2005, 109: 41-56.
- [2] 梁宗琦. 中国真菌志: 第 32 卷: 虫草属 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 1-190.
- [3] 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.
- [4] 王尊生, 俞永信, 袁勤生. 虫草属真菌的生物活性成分[J]. 中草药, 2004, 35(10): 附 8-11.
- [5] 肖建辉, 蒋依辉, 梁宗琦, 等. 虫草类真菌多糖的研究及应用前景[J]. 山地农业生物学报, 2003, 22(1): 70-76.
- [6] 陈祝安, 刘广玉, 胡菽英. 蝉花的人工培养及其药理作用研究[J]. 真菌学报, 1993, 12(2): 138-144.
- [7] 刘杰麟, 梁宗琦, 刘爱英. 古尼虫草子实体的人工培养[J]. 西南农业学报, 1990, 3(4): 6-10.
- [8] 俞永信. 人工培养冬虫夏草研究[J]. 菌物研究, 2004, 2(2): 42-46.
- [9] LIN Qun-ying, LI Tai-hui, SONG Bin. *Cordyceps guangdongensis* sp. nov. from China [J]. Mycotaxon, 2008, 103: 371-376.
- [10] 郑晴霞, 彭菲, 王凤翱. 蛹虫草的人工培育及组织学研究[J]. 湖南农业大学学报, 1995, 21(6): 581-583.
- [11] 任士升. 蛹虫草优质高产培育技术[J]. 食用菌, 1997(1): 35.
- [12] 张绪璋. 北冬虫夏草 C-48 生物学特性及栽培技术[J]. 食用菌, 2003(增刊): 12.
- [13] YAMANAKA K, INATOMI S, HANAOKA M. Cultivation characteristics of *Isaria japonica* [J]. Mycoscience, 1998, 39: 43-48.
- [14] 吴云鹤, 朱世瑛, 丁彦怀, 等. 北冬虫夏草的人工栽培条件及其子实体成分分析[J]. 食用菌学报, 1996, 3(2): 59-61.
- [15] 陈祝安. 虫生真菌蝉拟青霉的研究[J]. 菌物学报, 1991, 10(4): 280-287.
- [16] 高晓梅, 陈月仍. 光照对人工培养蛹虫草子实体形成和生长的影响[J]. 广东农业科学, 2006(6): 31-32.
- [17] 李春斌, 佟晓冬, 白静, 等. 蛹虫草子实体的人工培养研究[J]. 大连民族学院学报, 2004, 6(5): 29-31.
- [18] KANA-UCHI A, FUKATSU T. Light-induced fruit body formation of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes* [J]. Mycoscience, 1999, 40: 349-351.

【责任编辑 李晓卉】