

蛹虫草菌种复壮方法比较

夏淑春¹ 王学武² 郑长英¹ 鄢洪海^{1*}

(¹青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东青岛 266109; ²青岛市植物保护站, 山东青岛 266100)

摘 要: 蛹虫草菌种退化是蛹虫草栽培的关键问题。本试验采用子囊孢子分离复壮法、分生孢子分离复壮法、蚕蛹回接复壮法、基内菌丝分离复壮法等 4 种复壮方法, 通过比较不同复壮方法后代菌丝生长速度、转色速度及子实体形成情况, 初步判定子囊孢子分离复壮法和蚕蛹回接复壮法都有明显复壮效果。

关键词: 蛹虫草; 菌种; 复壮

中图分类号: S646.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 (2012) 12-0091-03

Comparison of Several Methods Applied to Rejuvenate *Cordyceps militaris* (L.) link

XIA Shu-chun¹, WANG Xue-wu², ZHENG Chang-ying¹, YAN Hong-hai^{1*}

(¹College of Plant Protection, Qindao Agricultural University, Qindao 266109, Shandong, China; ²Plant Protection Station of Qindao, Qindao 266100, Shandong, China)

Abstract: Strain degeneration is a key problem occurred in *Cordyceps militaris* (L.) link cultivation. In this study, four rejuvenation methods including isolation of ascospores, conidia, silkworm chrysalis and substrate mycelium were used. And the growth rate of mycelia, color changing speed and formation of stroma were investigated. The results indicated that two methods including isolation of ascospores and silkworm chrysalis had remarkable effects on rejuvenation.

Key words: *Cordyceps militaris* (L.) link; Strain; Rejuvenation

蛹虫草〔*Cordyceps militaris* (L.) link〕又名北虫草, 与冬虫夏草同属异种, 属子囊菌亚门 (*Ascomycotina*) 核菌纲 (*Pyrenomycetes*) 麦角菌目 (*Clavicipitales*) 麦角菌科 (*claviceptaceae*) 冬虫夏草属 (*cordyceps*)。它是蛹虫草真菌寄生在鳞翅目 (*Lepidoptera*) 夜蛾科昆虫蛹体上形成的子座与蛹体的结合体。蛹虫草有较高的食用价值和药用价值 (桂仲争 等, 2012), 2009 年卫生部批准为新资源食品, 因此, 近年来蛹虫草的人工栽培及开发利用发展迅速 (张传利 等, 2012)。但是, 人工栽培蛹虫草种菌种经过几代培养会出现菌丝生长慢、转色慢、生活力下降、出草率下降、出草慢等菌种衰退现象, 加强菌种复壮, 延缓菌种性能衰退, 保持原菌种优良性状, 是生产上亟待解决的问题。菌种衰退的内因是遗传变异, 是不可逆的变异 (李美娜 等, 2003)。菌种保存条件不当、无性繁殖体感染病毒、个体菌龄长、菌种老化等是菌种衰退的外因 (李美娜 等, 2003)。本试验通过对蛹虫草菌栽培种的几种复壮方法复壮后菌丝生长情况、栽培形状等比较, 了解不同方法的复壮效果, 寻找到适合的复壮方法, 为蛹虫草的人工栽培提供参考。

收稿日期: 2011-12-14; 接受日期: 2012-04-27

基金项目: “泰山学者”建设工程专项

作者简介: 夏淑春, 女, 副教授, 专业方向: 资源昆虫和害虫防治, E-mail: xiashuchun@yahoo.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author): 鄢洪海, 男, 教授, 专业方向: 农业植物病理学, E-mail: hhyan@qau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 菌种来源

2008年在青岛农业大学植物病理实验室进行试验。供试菌种由购买自大连蓝氏北虫草科技有限公司栽培菌种的内生菌丝上分离获得。选择无污染、生长旺盛的栽培菌种,用解剖针挑取先端菌丝,接种在PDA培养基上,18.5℃培养箱中避光培养。待菌丝长满后,选取无污染、生长旺盛的菌种保存待用。

1.2 菌种的分离复壮

1.2.1 蛹虫草菌种基内菌丝分离复壮 选择无污染、生长旺盛的栽培菌种,用解剖针挑取先端菌丝,接种在PDA培养基上,18.5℃培养箱中避光培养。待菌丝长满后,选取无污染、生长旺盛的菌种(CK)保存待用。

1.2.2 蛹虫草菌种分生孢子分离复壮 将灭菌的PDA培养基倒入灭菌的培养皿中,同时用接种环将少量培养基涂在培养皿盖内侧中央。待培养基凝固后,将蛹虫草菌接种在培养皿盖的培养基上。18.5℃无光照条件下培养。7d后培养皿盖接种的菌丝长满,并在培养皿底部的培养基上形成7个菌落。分别挑取7个菌落的菌丝,分别培养,分生孢子编号为1~7号。7d后菌种转管保存待用。

1.2.3 蛹虫草菌种子囊孢子分离复壮 在干净的培养皿盖的内侧中央粘贴0.5 cm×2.0 cm双面胶后灭菌。将灭菌的培养基倒入培养皿中,选择虫草子实体颜色深桔黄色、表面有稀疏的微小突起虫草成熟子实体黏在双面胶上,在19℃自然散射光条件下培养,使其子囊孢子弹落在培养基上。经过7d培养,在培养基上形成5个菌落,分别将5个菌落的菌丝转接到试管中培养,待试验。子囊孢子编号为1~5号。

1.2.4 蚕蛹回接复壮 将栽培菌基内菌丝接种在盛有PDA+蚕蛹培养基的试管内,18.5℃无光照条件下培养7d后,加入10 mL无菌水振荡,制成虫草菌悬浮悬液。

选择体型大、健康的柞蚕蛹,用镊子夹取酒精棉球,对蚕蛹表面消毒,用1 mL一次性注射器抽取悬液,将菌悬液注射蛹的翅膀下方,注射时针头向上倾斜刺入虫体。刺入深度以刚刚刺透体壁为宜,避免刺伤内部器官,注射量以有液体流出为宜。接种后蚕蛹放入灭菌的三角瓶中,18.5℃无光照条件下培养。待蛹体内菌丝长满,并在气门长出桔黄色菌蕾,选择其中4个蚕蛹,对蚕蛹体内菌丝分离培养,每个蚕蛹分离的菌种编号为1~4号。菌种保存在4℃冰箱中待用。

1.3 不同复壮方法比较

1.3.1 不同复壮菌种菌丝生长情况比较 将PDA+蚕蛹的培养基倒入直径9 cm灭菌的培养皿中,每皿10 mL,培养基凝固后接入各种分离获得的菌种,每个培养皿接种2个菌饼,3次重复。接种后培养皿19℃下避光培养,3d后开始每天记录菌落直径。在培养皿底部经过菌落中心用记号笔画两条交叉的直线,每天定时沿着两条线记录菌落直径。计算、统计菌落日生长量。

1.3.2 不同复壮菌种栽培性状比较 称取活体蚕蛹64 g、稻米610 g、蔗糖5 g,加入适量清水拌匀,平均分装入培养瓶中,拧好盖后放入高压灭菌锅中于126℃灭菌1 h,晾凉后接种不同分离方法获得的菌种,每个菌株接种3瓶。18.5℃下避光培养18d后调查菌丝生长情况;当菌丝长满后,将培养瓶放在20℃光照培养箱中见光培养,观察记录菌丝转色时间和子实体形成情况。

2 结果与分析

2.1 菌丝日均增长量比较

由表1可知,同种复壮方法的不同菌株间菌丝生长量差异不显著,表明菌株间变异不明显,

性状稳定。处理间菌丝生长量差异显著。蚕蛹回接分离、子囊孢子分离、分生孢子分离 3 种复壮方法菌丝生长速度快于对照 (基内菌丝分离), 达到极显著水平。3 种复壮方法之间菌丝生长速度没有显著差异。故就菌丝生长情况看, 3 种复壮方法都有复壮效果。

2.2 菌丝体转色和子实体形成

当菌丝体长满后, 将培养瓶放在 20 ℃ 光照培养箱中见光培养, 子囊孢子分离复壮法和蚕蛹回接分离复壮法菌种菌丝第 2 天转色, 颜色深橙黄色; 分生孢子分离后菌种菌丝转色慢, 颜色由金黄逐渐变成橙黄色, 转色时间长, 气生菌丝较多; 基内菌丝分离复壮法菌种菌丝转色最慢, 转色时间最长, 气生菌丝较多, 不易形成子实体。其他 3 种复壮方法的菌株都能形成子实体, 其中子囊孢子分离复壮法的菌株生长最好。用蚕蛹回接、子囊孢子分离、分生孢子分离法复壮后的菌种进行栽培后, 蚕蛹回接和子囊孢子分离的菌株菌丝体长满培养皿所需时间较短, 分别为 18.2、18.4 d; 分生孢子分离法次之, 为 19.3 d; 而用栽培种菌丝体分离培养后进行栽培, 其菌丝体的生长速度最慢, 达 20.5 d, 退化严重。

表 1 不同蛹虫草复壮方法菌丝日均生长量比较

复壮方法	菌株	日均生长量/cm	平均值/cm
蚕蛹回接	1	0.500	0.445 aA
	2	0.367	
	3	0.467	
子囊孢子	1	0.440	0.430 aA
	2	0.410	
	3	0.450	
	4	0.440	
	5	0.410	
分生孢子	1	0.433	0.403 aA
	2	0.367	
	3	0.344	
	4	0.467	
	5	0.344	
	6	0.400	
	7	0.467	
基内菌丝 (CK)	1	0.180	0.206 bB
	2	0.225	
	3	0.214	

注: 表中同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($\alpha=0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($\alpha=0.01$)。

3 结论与讨论

分生孢子分离法、子囊孢子分离法、蚕蛹回接分离法 3 种复壮方法中菌株间在菌丝生长量、菌种栽培性状两方面差异不显著, 说明这 3 种复壮方法都没有产生明显变异, 性状稳定。通过对分生孢子分离法、子囊孢子分离法、蚕蛹回接分离法和基内菌丝分离法等 4 种复壮方法菌丝生长量的比较, 子囊孢子分离法、蚕蛹回接分离法、分生孢子法都有较明显的复壮效果, 与基内菌丝分离法菌丝生长差异极显著; 不同分离方法的菌种栽培性状比较, 子囊孢子分离法、蚕蛹回接分离法在菌丝长满速度、转色速度、子实体形成情况都显著好于分生孢子分离法, 3 种分离方法栽培都能形成子实体; 基内菌丝分离法的菌种栽培性状严重退化, 不能形成子实体, 只有气生菌丝。所以, 菌龄长是蛹虫草菌种退化的重要原因之一, 与李美娜等 (2005) 及刘春良 (2010) 分析的菌种退化原因一致。蚕蛹回接分离法和子囊孢子分离法都有较好的复壮效果。

本试验中为了确保单胞分离, 分生孢子和子囊孢子都采取孢子弹射分离, 获得的菌落数较少。通过子囊孢子弹射法只获得 5 个菌落, 分析原因主要是目前尚不清楚孢子弹射的适宜条件。因此, 有必要对蛹虫草菌子囊孢子弹射的条件进行研究。同时, 也可以采用子囊孢子悬液单胞分离法进行菌种复壮。

参考文献

- 桂仲争, 滕国琴, 贾俊强, 葛正炎. 2012. 蛹虫草食药两用开发价值. 中国食物与营养, 18 (3): 70-73.
李美娜, 谢军, 李春燕. 2003. 人工栽培蛹虫草退化现象的分子分析. 菌物系统, 22 (2): 277-282.
刘春良. 2010. 无菌法培养和复壮北虫草母种技术. 食用菌, 32 (2): 27-28.
张传利, 白成元, 杨发军, 宁玲, 桂雪梅. 2012. 蛹虫草人工高产栽培技术. 种子世界, (3): 40-42.