

## 长座虫草子实体的人工诱导研究

刘洋, 潘丹丹, 丁海燕, 李春如\*, 樊美珍

(安徽农业大学微生物防治重点实验室, 合肥 230036)

**摘要:** 首次应用长座虫草的无性型—长座被毛孢对长座虫草子实体的生长条件进行了研究, 并确立了最佳的培养工艺。结果表明, 长座被毛孢液体摇瓶最佳培养时间为 9 d, 在营养液中添加 10% 的动物性蛋白(黄粉虫粉)有助于提高子实体产量, 其所需营养液最佳 pH 为 6.0, 培养温度为 25℃, 初期菌丝培养时间为完全黑暗培养, 待菌丝长满后给予 1~200 lx 连续光照, 可获得更多的子实体。

**关键词:** 长座虫草; 长座被毛孢; 子实体; 人工诱导; 培养条件

中图分类号: S476.12; Q933

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2012)05-0798-05

### Artificial induction of fruiting body of *Ophiocordyceps longissima*

LIU Yang, PAN Dan-dan, DING Hai-yan, LI Chun-ru, FAN Mei-zhen

(Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** The fruiting bodies of *Ophiocordyceps longissima* were cultured successfully using the strain of *Hirsutella longissima* RCEF3891, the anamorph of *O. longissima*, and the effect of different growth factors on fruiting bodies formation was studied in this paper. The results showed that the optimal culture conditions for fruiting bodies of *O. longissima* were as follows: 9 d of the liquid fermentation period of *H. longissima*, with addition of 10% animal protein in the medium, pH 6.0 of the nutrient solution, cultivation at 25℃, mycelia culture stage under the condition of complete darkness and continuous light (1-200 lx) after covering with mycelia.

**Key words:** *Ophiocordyceps longissima*; *Hirsutella longissima*; fruiting body; artificial induction; cultural conditions

泛义的虫草属 *Cordyceps sensu lato* 真菌是一类主要寄生于昆虫、蜘蛛和某些大团囊菌的地下子实体上, 利用寄主的营养并完成其生活史的虫菌复合体。国际真菌名录数据库 (<http://www.indexfungorum.org/Names/NAMES.ASP>) 2012 年列出的种名已达到 536 种, 我国的虫草资源丰富, 分布广泛, 目前已报道的虫草属种数约占总数的 1/4<sup>[1]</sup>。研究表明, 虫草属真菌含有多种生物活性物质, 具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、降血脂、杀虫、增强人体免疫功能, 能治疗人体多种疾病, 在医药、农业、食品工业及现代技术应用中具有广泛的应用价值<sup>[2-4]</sup>。

长座虫草 *Ophiocordyceps longissima* (Kobayasi) Sung et al. 是寄生于同翅目蝉若虫上的一种重要的

虫生真菌。1963 年, 它首次在日本发现并被命名<sup>[5]</sup>。1999 年, 李春如等在国内首次采到此虫草, 经鉴定, 其无性型为长座被毛孢 *Hirsutella longissima*, 并成功培育出未成熟的子座和孢梗束<sup>[6]</sup>。最近, Sung 等人对长座虫草菌丝体适宜生长条件进行了探索<sup>[7]</sup>。但是关于长座虫草其它方面的研究还未见报道。

研究子实体的人工培养具有多重意义, 它不仅能够确定虫草无性型和有性型的关系, 而且便于人们对相关虫草进行研究, 从而为开发该虫草提供了宝贵的资源。鉴于此, 人工培养虫草引起了人们极大关注。目前, 人工驯化虫草取得了一些成果<sup>[8-12]</sup>, 但是能进行产业化生产的虫草不过几种, 如蛹虫草和蝉花等。作者在前期研究的基础上首次对长座虫

收稿日期: 2012-03-13

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(863 计划)(No.2007AA021506)和教育部留学回国人员科研启动基金(2009 年)共同资助。。

作者简介: 刘洋, 女, 硕士研究生。E-mail: [fantasy\\_liuyang@126.com](mailto:fantasy_liuyang@126.com)

\* 通讯作者: 李春如, 男, 博士, 教授。E-mail: [chunruli@hotmail.com](mailto:chunruli@hotmail.com)

草子实体的生长条件进行了探索, 并筛选出了长座虫草子实体的最佳培养工艺, 为将来大规模开发利用长座虫草提供了重要的技术参数并奠定了良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源** 长座被毛孢 (*Hirsutella longissima*), 其有性型为长座虫草 (*Ophiocordyceps longissima*), 菌株编号为 RCEF 3891; 作为专利菌株, 保藏在中国科学院微生物菌种保藏中心, 菌株编号 CGMCC No.5826。

**1.1.2 主要仪器** 电子天平 (FA/JA)、豪华型超净工作台 (ZHJH-C)、高速分散器 (PT3100)、辅助移液器 (Mororized Pipetting Aid)、立式压力蒸汽灭菌器 (LS-B)、立式恒温振荡器 (IS-RD V3)、光照培养箱 (GZX-III)、电热恒温鼓风干燥箱 (DHG)、专业级照度计 (TES-1339)、人工模拟环境培养室。

**1.1.3 培养基** (1) 斜面活化培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 自然,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

(2) 液体摇瓶种子培养基: 葡萄糖 40 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸出粉 10 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 自然,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

(3) 子实体栽培培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 10 g, 麦芽糖 10 g, 蛋白胨 10 g,  $MgSO_4$  1.5 g,  $KH_2PO_4$  3 g, 复合维生素 B 4 片 $\cdot L^{-1}$ , 柠檬酸三胺 0.4 g, 加蒸馏水至 1 000 mL。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌种活化** 将 RCEF3891 菌株转接到斜面活化培养基上, 25℃光照培养 10~15 d, 菌丝隆起约 2 mm, 菌丝白色略带微红。

**1.2.2 液体摇瓶培养时间确定** 取 250 mL 三角瓶装入 100 mL 液体摇瓶种子培养基,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min 后, 将活化的供试斜面菌株接入三角瓶中, 置于摇床上 25℃, 130 r $\cdot min^{-1}$  黑暗培养 10 d, 得到一级种子液; 将一级种子液用高速分散器打散, 按 5% (v/v) 的接种量转接到 20 瓶装有 100 mL 液体摇瓶种子培养基的三角瓶中, 培养条件同上。每隔 3 d 取出 2 瓶种子液, 抽滤后烘干至恒重。准确称量后记录菌丝干重, 并观察菌丝的生长变化。

**1.2.3 子实体栽培培养基的配制与灭菌** 取 400 mL 罐头瓶, 每瓶装 20 g 优质大米, 按照 1:2 的料液比加入子实体栽培培养基, 瓶口用耐高温聚丙烯薄膜进行覆盖, 用橡皮筋扎紧。摇匀浸泡 2 h 后,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

$\times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

**1.2.4 培养基中添加动物性蛋白对子实体生长的影响** 在子实体栽培营养液中分别添加 0%、2%、4%、6%、8%和 10%的黄粉虫粉, 按照上述方法配制, 每个处理设置 3 个重复(下同)。高温高压灭菌冷却后接种, 于相同条件下培养。记录子实体形成情况、子实体和孢梗束总干重及平均高度(下同)。

**1.2.5 不同 pH 对子实体生长的影响** 将子实体栽培营养液 pH 分别调节到 4、5、6、7 和 8, 高温高压灭菌后冷却, 接种后于相同条件下培养。

**1.2.6 不同温度对子实体生长的影响** 栽培培养基接种后置于以下温度的培养箱进行培养: 18℃恒温、25℃恒温、初期 18℃菌丝长满后转为 25℃培养、初期 25℃菌丝长满后转为 18℃培养。

**1.2.7 不同光照时间对子实体生长的影响** 栽培培养基接种后置于以下环境进行培养: 24 h 避光、24 h 光照、模拟自然环境 (12 h 光照 12 h 避光)、初期避光待菌丝长满后 24 h 光照、初期避光待菌丝长满后模拟自然环境。其它培养条件一致。

**1.2.8 不同光照强度对子实体生长的影响** 培养箱中的光照强度分别设置为: 0、1~100、101~200、201~300、301~400、401~500、501~600、601~700、701~800、801~900、901~1 000 lx。其它培养条件一致。

**1.2.9 最适培养条件的验证** 按照筛选出的最适培养条件进行培养, 以最初培养条件进行对照, 每个处理设置 5 个重复, 记录子实体和孢梗束总干重。

### 1.3 数据分析

数据用 Excel 2003 和 DPS v7.05 进行处理, 以 Duncan 新复极差法进行数据间的显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 液体摇瓶培养时间确定

摇瓶菌丝体从第 3 天开始生长, 但是还未生成菌丝球; 培养 4~6 d, 摇瓶内隐约可见小黄米大小的菌丝球, 瓶壁边缘有一条极细菌丝带, 粘结不紧密; 培养 7~9 d, 菌丝球数量明显增多, 菌丝球的直径也开始变大, 菌丝球肉色, 较疏松; 培养 10~15 d, 菌丝球数量继续增加, 质地逐渐变硬, 边缘菌丝带变宽, 粘结紧密, 发酵液变得悬浊; 培养 15~21 d, 菌丝球数量增加不明显; 培养 22~30 d, 菌丝球数量有减少趋势, 这可能与营养物质的消耗、次级代谢物质的生成有关。由图 1 看出, 种子液从 9 d 左右生长速率达到最大, 21 d 菌丝体干重达到最高, 之后菌丝体干重逐渐减少, 整个过程符合生长规律。故确定该液体摇瓶种子液的最佳培养时间为 9 d。

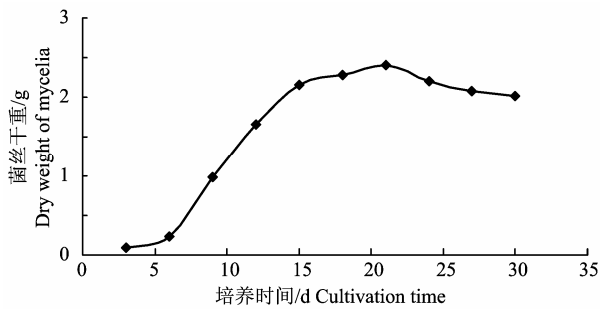


图1 液体摇瓶种子液不同培养时间菌丝干重变化曲线  
Figure 1 Curve of dry mycelia weight of liquid seeds at different culture time

## 2.2 培养基中添加动物性蛋白对子实体生长的影响

由表1可以看出,培养基中添加动物性蛋白对子实体生长有显著影响。动物性蛋白含量越高,子实体形成的数量越多,总干重越大。添加10%的动物性蛋白所得到的子实体和孢梗束总干重比未添加的多了2倍,子实体形成情况和子实体和孢梗束平

均高度也显著高于其它处理,说明长座虫草子实体在营养丰富的培养基中更容易形成。因此,培养基中添加10%的动物性蛋白有助于提高子实体的产量。

## 2.3 不同pH对子实体生长的影响

由表2可以看出,不同pH对子实体生长具有显著影响。就子实体形成情况和平均高度而言,pH 6、pH 7这2种处理方法所得到的子实体数目及平均高度显著高于其它处理。pH 8所形成的子实体数目比pH 5多,但平均高度差异不显著。pH 4这种处理最不宜于子实体的生长,只能形成少量孢梗束,平均高度也最矮,说明长座子实体不宜在过酸的环境中生长。就子实体和孢梗束总干重而言,pH 6所得到的长座虫草产量最高,达到了 $1.85 \text{ g}\cdot\text{瓶}^{-1}$ ,是pH 4产量的1.8倍,显著高于其它处理。综上所述,栽培营养液pH为6时最适宜长座虫草子实体的生长,所得到的产量也最高。

表1 添加动物性蛋白对子实体生长的影响

Table 1 Effects of adding animal protein on fruiting body growth

动物性蛋白含量/% Content of animal protein	子实体形成情况 Formation of fruiting bodies	子实体和孢梗束平均高度/cm Mean height of fruiting bodies and synnemata	子实体和孢梗束总干重/g Total dry weight of fruiting bodies and synnemata
0	+	$2.88\pm 0.10^e$	$1.13\pm 0.05^e$
2	++	$3.85\pm 0.15^d$	$1.99\pm 0.05^d$
4	+++	$4.50\pm 0.25^c$	$2.12\pm 0.06^c$
6	+++	$4.43\pm 0.15^c$	$2.23\pm 0.08^c$
8	++++	$5.37\pm 0.13^b$	$2.98\pm 0.05^b$
10	++++	$6.43\pm 0.28^a$	$3.20\pm 0.09^a$

注:“++++”表示子实体数量很多,“+++”表示子实体数量较多,“++”表示子实体数量较少,“+”表示子实体数量很少;同列不同小写字母按Duncan新复极差多重统计比较法,在5%概率水平上差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Note:“++++” means lots of fruiting bodies formation;“+++” means more fruiting bodies formation;“++” means less fruiting bodies formation;“+” means few fruiting bodies formation. Different lowercases in the same column mean significantly different at  $p<0.05$  according to the Duncan's New Multiple-Range Test. The same below.

表2 不同pH对子实体生长的影响

Table 2 Effects of different pH on fruiting body growth

pH	子实体形成情况 Formation of fruiting bodies	子实体和孢梗束平均高度/cm Mean height of fruiting bodies and synnemata	子实体和孢梗束总干重/g Total dry weight of fruiting bodies and synnemata
4	-	$1.03\pm 0.06^c$	$1.03\pm 0.02^d$
5	++	$1.87\pm 0.06^b$	$1.45\pm 0.06^{bc}$
6	++++	$2.55\pm 0.13^a$	$1.85\pm 0.04^a$
7	++++	$2.40\pm 0.10^a$	$1.51\pm 0.07^b$
8	+++	$1.85\pm 0.05^b$	$1.42\pm 0.01^c$

注:“-”表示没有子实体生成。下同。Note:“-” means no fruiting body formation. The same below.

## 2.4 不同温度对子实体生长的影响

由表3可以看出,不同温度对子实体生长影响显著。25℃和18→25℃这2种培养方法所形成的子

实体数量最多,子实体和孢梗束总干量最高。但是培养初期,菌丝在18℃培养条件下生长较慢,菌丝长满约20d左右,不仅延长了虫草的培养时间,所

得到的子实体和孢梗束总干重和平均高度都不及 25℃ 恒温培养, 不能显著增加虫草的产量。而 18℃ 和 25→18℃ 这 2 种培养方法都不能得到子实体, 仅

有少量孢梗束生成, 总干重和平均高度最低。因此, 25℃ 恒温是长座虫草子实体生长的最适温度。

表 3 不同温度对子实体生长的影响

Table 3 Effects of different temperature on fruiting body growth

温度/℃ Temperature	子实体形成情况 Formation of fruiting bodies	子实体和孢梗束平均高度/cm Mean height of fruiting bodies and synnemata	子实体和孢梗束总干重/g Total dry weight of fruiting bodies and synnemata
18	-	0.52±0.03 <sup>c</sup>	0.83±0.04 <sup>c</sup>
25	+++	2.12±0.08 <sup>a</sup>	1.29±0.01 <sup>a</sup>
18→25	+++	1.50±0.05 <sup>b</sup>	1.22±0.04 <sup>a</sup>
25→18	-	0.48±0.03 <sup>c</sup>	0.95±0.06 <sup>b</sup>

表 4 不同光照时间对子实体生长的影响

Table 4 Effects of different illumination time on fruiting body growth

每天光照时间/h Illumination time per day	子实体形成情况 Formation of fruiting bodies	子实体和孢梗束平均高度/cm Mean height of fruiting bodies and synnemata	子实体和孢梗束总干重/g Total dry weight of fruiting bodies and synnemata
0	-	3.03±0.06 <sup>a</sup>	1.46±0.03 <sup>b</sup>
24	++	2.23±0.06 <sup>b</sup>	1.48±0.03 <sup>b</sup>
12	-	1.85±0.05 <sup>c</sup>	1.17±0.06 <sup>d</sup>
初期 0→后期 12 Initial stage 0→Late stage 12	+	1.93±0.08 <sup>c</sup>	1.23±0.01 <sup>c</sup>
初期 0→后期 24 Initial stage 0→Late stage 12	++++	2.17±0.06 <sup>b</sup>	1.55±0.01 <sup>a</sup>

表 5 不同光照强度对子实体生长的影响

Table 5 Effect of different illumination intensity on fruiting body growth

光照强度/lx Illumination intensity	子实体形成情况 Formation of fruiting bodies	子实体和孢梗束平均高度/cm Mean height of fruiting bodies and synnemata	子实体和孢梗束总干重/g Total dry weight of fruiting bodies and synnemata
0	-	3.70±0.10 <sup>a</sup>	1.67±0.07 <sup>b</sup>
1~100	++++	2.20±0.10 <sup>b</sup>	1.79±0.03 <sup>a</sup>
101~200	++++	2.03±0.06 <sup>c</sup>	1.76±0.01 <sup>a</sup>
201~300	+++	1.98±0.03 <sup>c</sup>	1.67±0.03 <sup>b</sup>
301~400	+++	1.73±0.06 <sup>d</sup>	1.62±0.06 <sup>b</sup>
401~500	++	1.65±0.05 <sup>d</sup>	1.64±0.04 <sup>b</sup>
501~600	+	1.52±0.08 <sup>e</sup>	1.65±0.03 <sup>b</sup>
601~700	+	1.27±0.06 <sup>f</sup>	1.53±0.03 <sup>c</sup>
701~800	+	1.28±0.08 <sup>f</sup>	1.48±0.04 <sup>cd</sup>
801~900	-	1.22±0.08 <sup>f</sup>	1.45±0.02 <sup>d</sup>
901~1 000	-	1.17±0.06 <sup>f</sup>	1.43±0.07 <sup>d</sup>

## 2.5 不同光照时间对子实体生长的影响

由表 4 可知, 不同光照时间对子实体生长影响显著。一直避光培养时, 没有子实体形成, 产生大量白色孢梗束, 较疏松, 平均高度为 3.03 cm, 显著高于其它处理; 模拟自然光照和初期避光后期模拟自然光照这 2 种处理也未形成或形成少量子实体, 产生的孢梗束致密, 白色略带粉红色, 高度显著低于其它处理; 一直光照时有少量子实体生成, 子实

体和孢梗束总干重与一直避光所得到的虫草总干重差异不显著。初期避光后期 24 h 光照所得到的子实体数量最多, 子实体和孢梗束总干重最大, 显著高于其它处理。因此, 初期避光培养, 待菌丝体长满后 24 h 光照, 可以形成更多的长座虫草子实体。

## 2.6 不同光照强度对子实体生长的影响

由表 5 可知, 不同光照强度对子实体生长有显著影响。暗培养时, 没有子实体生成, 产生大量白

色孢梗束,平均高度为 3.70 cm,显著高于光照培养。光照强度为 1~200 lx 时,所形成的长座虫草子实体数量最多,子实体和孢梗束总干重最大。随着光照强度的增加,子实体生长能力逐渐下降,平均高度与总干重也随之降低。可见,光照强度与子实体的形成能力成反比。由此得知,长座虫草子实体生长时需要适当的光照,1~200 lx 为最佳光照强度;而孢梗束生成的最佳条件为完全避光培养。

### 2.7 最适培养条件的验证

根据上述单因素实验得到的最优参数设计实验,当子实体生长健壮几乎不再生长时采收(90 d 左右),子实体和孢梗束总平均干重达到 2.19 g·瓶<sup>-1</sup>,是最初培养条件的 2.38 倍。说明此实验筛选出的长座虫草培养工艺为较优工艺,可以进行大规模培养。

## 3 讨论

子实体的广义概念指真菌中任何产生孢子的结构。但通常指高等真菌中高度组织化的产生有性孢子的结构。孢梗束通常由致密或黏结的、直立的、具有分枝和孢子的分生孢子梗组成并簇生形成的产孢结构。人工培养的长座虫草子实体为肉桂色、子座棒状、单生或丛生,长 1~7 cm,直径 1~2 mm;孢梗束成树状分枝,丛生,白色或白色略带粉红色。人工诱导子实体时,经常出现伴有孢梗束一起生长的现象。若要得到大量的纯孢梗束,采取完全避光的方法,其余生长条件如同子实体的培养方法。在子实体培养后期,一些子座的顶部和上端伸出大量白色孢梗束,此现象表明,长座虫草的有性型能向无性型转化。

人工成功诱导子实体需要控制诸多因素,采用可靠的方法正确分离虫草的无性型是实验成功的首要前提。组织分离和子囊孢子分离是常用的 2 种分离虫草无性型的方法<sup>[13]</sup>。其次,模拟虫草的自然环境是子实体培育成功的关键。野生虫草产地的气候、土壤 pH、光照、寄主的营养组成等因素都是人工诱导子实体的重要参照。除此之外,优良的菌株也是提高子实体产量的必备条件。在实验中,避免多次对菌株进行传代培养,研究菌株的复壮方法有利于保证菌株的质量,进而提高子实体的产量。

本试验研究表明,人工诱导子实体的生成需要的营养成分丰富,在栽培营养液中添加动物性蛋白有利于提高长座虫草子实体的产量。长座虫草子实体生长的最适温度为 25℃,低温不利于原基和子实

体的生成。子实体生长时良好的通气和充足的光照对子实体产生和生长有不利作用<sup>[14]</sup>。初期避光培养有利于菌丝的生长,约 10 d 后菌丝长满,补充适宜的光照有利于原基的生成,但子实体生长过程中不需要较强的光照,小于 200 lx 为宜。

人工培养出的长座虫草子实体具有独特的香味,野生长座虫草经常有被动物啃食的现象,推测长座虫草可能具有一定的食用价值,但尚需进一步研究。

## 参考文献:

- [1] 宋斌,林群英,李泰辉,等. 中国虫草属已知种类及其分布[J]. 菌物研究, 2006, 4(4): 10-26.
- [2] Ng T B, Wang H X. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2005, 57 (12): 1509-1519.
- [3] Xiao J H, Xiao D M, Sun Z H, et al. Chemical compositions and antimicrobial property of three edible and medicinal *Cordyceps* species[J]. Journal of Food Agriculture and Environment, 2009, 7 (3/4): 91-100.
- [4] Zhou X, Gong Z, Su Y, et al. *Cordyceps* fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2009, 61 (3): 279-291.
- [5] Kobayasi Y, Shimizu D. Monographic studies of *Cordyceps* 2. group parasitic on Cicadidae[J]. Bulletin of the National Science Museum, 1963, 6: 286-314.
- [6] 李春如,樊美珍,黄勃,等. 被毛孢属一新种—长座虫草的无性型[J]. 菌物系统, 2001, 20 (1): 29-34.
- [7] Sung G H, Shrestha B, Han S K, et al. Growth and cultural characteristics of *Ophiocordyceps longissima* collected in Korea[J]. Mycobiology, 2011, 39 (2): 85-91.
- [8] Lee J O, Shrestha B, Kim T W, et al. Stable formation of fruiting body in *Cordyceps bassiana*[J]. Mycobiology, 2007, 35: 230-234.
- [9] 董建飞,肖岩岩,陈超,等. 台湾虫草子实体人工培养条件的初步研究[J]. 中国微生物学杂志, 2011, 23(4): 298-301; 305.
- [10] 李春如,南圣姬,耿德贵,等. 十七种虫草的子实体培育研究[J]. 菌物学报, 2007, 25 (4): 639-645.
- [11] 刘杰麟,梁宗琦,刘爱英. 古尼虫草子实体的人工培养[J]. 西商农业学报, 1990, 3 (4): 6-10.
- [12] Kim S Y, Shrestha B, Sung G H, et al. Optimum conditions for artificial fruiting body formation of *Cordyceps cardinalis*[J]. Mycobiology, 2010, 38: 133-136.
- [13] 梁宗琦. 古尼虫草分生孢子阶段的分离和鉴定[J]. 真菌学报, 1985, 4 (3): 162-166.
- [14] 李用芳. 影响虫草子实体生长的因素探讨[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(4): 51-54.