



陶海平, 曹莉, 韩日畴. 糖类和植物生长调节剂对冬虫夏草子实体人工培养的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (2): 274 - 281.

糖类和植物生长调节剂对冬虫夏草子实体人工培养的影响

陶海平^{1,2}, 曹莉², 韩日畴^{2*}

(1. 华南农业大学农学院, 广州 510640;

2. 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广东省生物资源应用研究所, 广州 510260)

摘要: 为提高人工培养冬虫夏草子实体的产量, 需要优化其培养参数。本实验测定培养基中糖类和植物生长调节剂对冬虫夏草子实体产量的影响。于大米小麦作为主要组分的培养基中接入冬虫夏草菌, 在 9 ~ 13℃ 下培养 60 d, 转入 4℃ 培养。葡萄糖培养基中, 冬虫夏草子实体干重是麦芽糖培养基中的 7.6 倍, 出现菌丝和收获子实体的时间也比麦芽糖培养基中至少快 2 个月; 蔗糖培养基中未获得子实体。不同种类和浓度植物生长调节剂对冬虫夏草子实体产量影响显著。于菌液中加入环磷腺苷、三十烷醇和玉米素的培养瓶均未发现菌丝生长。加入 100 μg/mL 6-苄氨基腺嘌呤的培养瓶可见菌丝生长, 但未见原基分化。转入 4℃ 下 6 个月后, 与对照相比, 加入 100 μg/mL 吲哚乙酸、1 μg/mL 和 100 μg/mL 吲哚丁酸、10 μg/mL 赤霉素、1 μg/mL 和 10 μg/mL 乙烯利, 以及 1 μg/mL 2, 4-D 的培养瓶中子实体干重均显著提高, 其中加入 1 μg/mL 吲哚丁酸和 1 μg/mL 2, 4-D 的培养瓶的子实体干重是对照的 15 倍。实验结果为优化冬虫夏草子实体人工培育提供了支撑。

关键词: 冬虫夏草菌; 子实体; 糖类; 植物生长调节剂

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 02-274-08

Influence of medium components and plant growth regulators on artificial production of fruiting bodies of *Ophiocordyceps sinensis*

TAO Hai-Ping^{1,2}, CAO Li², HAN Ri-Chou^{2*} (1. College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, China)

Abstract: To increase the yields of fruiting bodies of *Ophiocordyceps sinensis* for artificial production, it is necessary to optimize the culture parameters. In this study, the influence of sugars, light and plant growth regulators on the yields of fruiting bodies of *O. sinensis* was determined. The media containing rice and wheat in 100 mL bottles were inoculated with fungal inocula and cultured at 9 ~ 13℃ for 60 d, and then at 4℃. The dry weight of fruiting bodies from the medium with glucose was 7.6 times more than that from the medium with maltose, and the mycelia and fruiting bodies from the medium with glucose appeared in two months ahead compared with the medium with maltose. No fruiting body was observed on the medium with sucrose. Significant differences were recorded among the dry weights of fruiting bodies from the media

基金项目: 广州市科技计划项目 (201604020030, 201803010087); 国家自然科学基金项目 (31900368); 广东省科学院青年引导专项 (2019GDASYL-0105048)

作者简介: 陶海平, 女, 硕士, 研究生, 研究方向为冬虫夏草子实体的人工优化培养, E-mail: 13007362926@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 韩日畴, 博士, 研究员, 主要从事资源昆虫、冬虫夏草研发以及新型生物杀虫剂产业化研究, E-mail: hanrc@gdei.gd.cn

收稿日期 Received: 2019-12-09; 接受日期 Accepted: 2020-01-17

containing different plant growth regulators. No mycelia were observed from the media containing 3', 5'-cyclic AMP, triacontanol and zeatin. Mycelia but no stroma were observed from the media with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6-benzyl adenine. After 6 months at 4 $^{\circ}\text{C}$, the dry weights of fruiting bodies from the media containing 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indole-3-acetic acid, 1 $\mu\text{g}/\text{M}$ or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indole-3-butyric acid, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gibberellin acid, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethephon, or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid were significantly higher than that from the control (without any plant growth regulators). Especially, the dry weights of fruiting bodies from the media containing 1 $\mu\text{g}/\text{M}$ indole-3-butyric acid or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid were 15 times more than that from the control. The present results provide supports for optimized artificial production of fruiting bodies of *O. sinensis*.

Key words: *Ophiocordyceps sinensis*; fruiting body; sugars; light; plant growth regulator

冬虫夏草是青藏高原特有的名贵生物资源, 由冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 侵染蝙蝠蛾 *Thitarodes/Hepialus* 幼虫形成的幼虫尸体与真菌子座复合物 (丘雪红等, 2016; 韩日畴等, 2019)。冬虫夏草含有多种活性成分, 如多糖、核苷、甾醇、虫草酸等, 具有免疫调节、抗氧化、抗衰老、抗疲劳、抗菌、抗肿瘤、护肝肾等广泛药理作用, 与人参、鹿茸并称“中药三大宝” (Lo *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014; 丘雪红等, 2016; 韩日畴等, 2019)。

由于冬虫夏草菌寄主单一, 蝙蝠蛾幼虫生长期长、生长环境苛刻、加上人类过度采挖, 野生冬虫夏草日趋枯竭, 现已被纳入濒危物种 (李文佳等, 2016)。为了满足人们对冬虫夏草的正当需求, 保护野生冬虫夏草资源, 人工培育是必由之路。于广州低海拔实验室, 从四川、云南、青海分离获得的冬虫夏草菌在米饭培养基中成功培育出具有子囊孢子的冬虫夏草子实体 (曹莉和韩日畴, 2014; Cao *et al.*, 2015), 这不仅为冬虫夏草菌的产业化开辟了新途径, 同时直接证明了中国被毛孢 *Hirsurella sinensis* 为冬虫夏草菌真正的无性型。菌株筛选、培养基组分、温度以及诱导剂是冬虫夏草子实体生长的关键因子 (韩日畴等, 2019)。

冬虫夏草菌在固体和液体培养基中可观察到分生孢子、芽生孢子和菌丝。冬虫夏草菌的最佳生长温度是 18~20 $^{\circ}\text{C}$, 温度高于 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 菌丝停止生长。最适的 pH 范围为 5~6; 最佳碳源是葡萄糖, 氮源是蛋白胨 (王忠, 2001a, b)。于液体培养基中麦芽糖比葡萄糖更有利于获得高产量的芽生孢子 (Liu *et al.*, 2019)。冬虫夏草菌液体培养参数包括接种量、温度、pH、通气等 (李春如等, 2004; 刘欣等, 2013; 毛雄民等, 2013; Mei

et al., 2013; 贺宗毅等, 2016; 李婷婷, 2017)。从新鲜冬虫夏草不同部位分离得到的菌株在固体培养基上特性不同; 单子囊孢子、双子囊孢子和多子囊孢子菌株固体发酵时菌丝生长旺盛, 分生孢子产量显著高于组织分离菌株 (吕延华等, 2016)。

不同菌株和培养基对子实体产量影响显著, 如采自四川 KD1202、云南的 YN1202 和青海的 QH1208 冬虫夏草菌株在人工培养基上子实体出草率分别为 50%~67%、30%~35% 和 3%~5% (Cao *et al.*, 2015)。在食用菌或其它真菌子实体培养过程中, 经常使用安全的植物生长调节剂如吲哚乙酸、赤霉素和 2, 4-二氯苯氧乙酸等提高子实体的产量 (张慧锋, 2005; 徐莉等, 2008; 李珍等, 2016)。这些化学试剂通过调节细胞分裂、细胞增殖、细胞分化和极性, 以及促进器官 (如根、枝条、叶、花和果) 发育发挥不同的作用, 还调控植物各个生长过程, 以及与病原和共生菌的相互作用 (Ludwig-Müller, 2015; Frick *et al.*, 2018)。国际上已把植物生长调节剂应用作为 21 世纪农业实现超产的主要措施之一 (朱杰丽等, 2013)。

但是, 目前冬虫夏草子实体人工培养的参数仍未优化。为了优化人工培养参数, 本实验测定培养基中糖类和植物激素对冬虫夏草子实体产量的影响。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

冬虫夏草菌种 KD1223 从中国四川省康定野生冬虫夏草中采用常规方法分离、纯化获得 (Cao *et al.*, 2015)。以 15% 甘油贮存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.2 主要试剂

Hipure Fungal DNA Mini Kit II 试剂盒购自 Magen 公司 (中国, 广州)。氯仿、异丙醇、乙醇、蛋白胨、磷酸二氢钾、硫酸镁、柠檬酸铵、维生素 B1、氯化钠、酵母膏等购自广州化学试剂厂; 葡萄糖、蔗糖、购自广州化学试剂厂, 麦芽糖购自 BioForxx GmbH, 蚕蛹粉购自广东信达茧丝绸股份有限公司。十种化学试剂如 6-苄氨基腺嘌呤 (6-benzyl adenine, 6-BA)、环磷腺苷 (3', 5'-cyclic AMP)、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)、乙烯利 (ethephon)、赤霉素 (gibberellin acid, GA)、吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)、吲哚丁酸 (indole-3-butyric acid)、 α -萘乙酸 (α -Naphthalene acetic acid, α -NAA)、三十烷醇 (triacontanol) 和玉米素 (zeatin) 购自 Sigma 公司。5%、15%、31%、50% 的乙醇分别用于溶解 α -NAA, 吲哚乙酸、玉米素、吲哚丁酸、2,4-D, 2% NaOH 用于溶解 6-BA, 1%、4.8% 的二甲亚砷 (DMSO) 分别用于溶解乙烯利、赤霉素, 纯氯仿用于溶解三十烷醇。配制的试剂在超净工作台上以细菌过滤器 (0.22 μ M, Gelman Sciences) 过滤后使用。

1.2 培养基

固体 LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 琼脂粉 16 g/L, 高压蒸汽灭菌 30 min。液体 PPDA: 每 1 L 水中加入 200 g 去皮土豆, 20 g 葡萄糖, 10 g 蛋白胨, 3 g 磷酸二氢钾, 1.5 g 硫酸镁, 20 mg 维生素 B1, 121 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 30 min。固体 PPDA: 每 1 L 固体 PPDA 培养基在液体 PPDA 培养基加 16 g 琼脂粉。PM 液体培养基: 每 1 L 水中加入 200 g 去皮土豆, 20 g 麦芽糖, 10 g 蛋白胨, 3 g 磷酸二氢钾, 1.5 g 硫酸镁, 20 mg 维生素 B1, 121 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 30 min。

大米小麦培养基: 100 mL 的培养瓶中加入大米 8 g、小麦 8 g、蚕蛹粉 0.4 g, 营养液 22 mL; 营养液配方为每 1 L 营养液中糖类 20 g (葡萄糖、麦芽糖或蔗糖), 蛋白胨 5 g, 磷酸二氢钾 2 g, 硫酸镁 1 g, 柠檬酸铵 1 g, 维生素 B1 20 mg; 将培养基组分加入 100 mL 的培养瓶中, 室温下浸泡 1 h, 然后 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 1 h, 冷却至室温备用。

1.3 菌种鉴定

以 Hipure Fungal DNA Mini Kit II 试剂盒提取液体 PPDA 培养基中 (100 rpm, 9~13 $^{\circ}$ C) 已培养

30 d 的冬虫夏草菌 DNA。以 DNA 为模板, 参照冬虫夏草菌通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')、ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGG-3') 扩增核糖体 DNA (ITS; ITS1-5.8S-ITS2) 序列 (Cao *et al.*, 2015), 以 2 \times Easy Taq PCR Super Mix 进行 PCR。反应体系 (25 μ L): 2 \times Easy Taq PCR SuperMix 12.5 μ L, DNA 1 μ L, 正反向引物各 1 μ L, 用 ddH₂O 补充至 25 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 (120 V, 20 min)。将 PCR 产物送至上海生工生物公司测序, 测序结果于 NCBI 中 BLAST 进行比对, 同时构建进化树证实比对结果。

1.4 子实体培养参数测定

本论文测定的培养参数包括营养液中的糖类 (葡萄糖、麦芽糖、蔗糖) 和植物生长调节剂。

总体培养方法如下: 于超净工作台上将冬虫夏草菌培养的子实体以无菌剪刀剪碎, 再以无菌镊子夹取 2~3 块 (长约 0.5 cm) 加入液体 PPDA 培养基中, 置于 120 rpm 摇床、9~13 $^{\circ}$ C 下培养 60 d; 以 PPDA 和 LB 平板检测所培养的菌液是否被污染; 从上述培养液中取 1~3 mL 转接至新的液体 PPDA 培养基中, 同样条件下培养 30 d。培养 30 d 的菌液稀释一倍后, 以每瓶 12 mL 量 (每毫升含分生孢子 3×10^9 个, 芽生孢子 4.5×10^6 个) 加入上述大米小麦培养基中, 将培养瓶置于 9~13 $^{\circ}$ C 下培养 60 d, 当米饭小麦培养基表面菌丝全部覆盖时, 将培养瓶置于 4 $^{\circ}$ C 下诱导原基分化, 根据不同参数确定不同时间收获子实体。

营养液中加入不同糖类 (葡萄糖、麦芽糖、蔗糖) 的大米小麦培养基中接入 PPDA 培养基培养 30 d 的菌液后, 9~13 $^{\circ}$ C 下培养 60 d, 然后置于 4 $^{\circ}$ C 下分别培养第 9、10、11 个月后收获子实体, 将收获的子实体置于烘箱 (80 $^{\circ}$ C, 5 h) 烘干至恒重, 记录不同处理的子实体干重和每瓶的条数。该实验每个处理设 14 培养瓶, 3 个重复, 共 42 瓶。每次随机取样 4 瓶, 收获子实体。

植物生长调节剂对子实体生长影响测定步骤如下: 将 10 μ L 的各种化学试剂与 12 mL 菌液混合, 使每毫升菌液中各种化学试剂的浓度分别为 1 μ g、10 μ g 或 100 μ g, 然后分别加入含大米小麦培养基的培养瓶中。以菌液中分别加入 5%、15%、31%、50% 乙醇, 2% NaOH, 1%、4.8%

DMSO, 100% 氯仿作为对照。按照上述方法培养, 4℃ 培养后 8 个月采收子实体。该实验每个处理设 14 培养瓶, 3 个重复, 共 42 瓶。每次随机取样 10 瓶, 收获子实体。

1.5 数据分析

不同处理下冬虫夏草菌子实体的干重值以 SPSS 软件 (16.0 software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行 T 检验和方差分析。以 Tukey 进行处理组之间多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异性显著。

2 结果与分析

2.1 冬虫夏草菌鉴定

以 ITS4、ITS5 引物对冬虫夏草菌 DNA 进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物测序, 得到的序列在 NCBI 数据库中进行 Blast, 发现与业已报道冬虫夏草菌的序列 (序列号: EU570927.1) (张捷, 2016) 相似度达 99%, 同时进化树也证明实验采用菌株为冬虫夏草菌。

2.2 含糖培养基对子实体培养的影响

冬虫夏草菌在大米小麦培养基中培养 2 个月之后检查 3 种糖在培养基中菌丝的生长状况。葡萄糖培养基和蔗糖培养基中冬虫夏草菌菌丝已经覆盖培养基表面, 呈灰白色; 麦芽糖培养基中冬虫夏草菌菌丝生长缓慢, 菌丝呈稀疏分布, 处于米黄色状态。说明冬虫夏草菌在麦芽糖培养基中比在葡萄糖和蔗糖中的长得慢。

培养瓶转入 4℃ 下 7 个月进行子实体第一次采收。葡萄糖培养基中冬虫夏草子实体长势最好, 条数均值为每瓶 8.33 条, 干重均值为 0.4 g; 麦芽糖和蔗糖培养基中均未长出子实体。

培养瓶转入 4℃ 下 9 个月后, 对冬虫夏草子实体进行第二次采收。葡萄糖培养基中冬虫夏草子实体已完成生长 (子实体占满培养瓶, 且没有白色气生菌丝, 图 1), 麦芽糖培养基中此时只有短小的子实体, 说明葡萄糖培养基中子实体生长比麦芽糖培养基中的快至少 2 个月; 而蔗糖培养基中仍未长出子实体且在培养瓶内出现大量的气生菌丝。

将收获的子实体用烘箱 (80℃, 5 h) 烘干至恒重。葡萄糖和麦芽糖培养基的子实体干重显著差异 ($t = 3.17$, $df = 5.148$, $P = 0.024 < 0.05$) (图 2)。培养基中含葡萄糖时冬虫夏草子实体产量是麦芽糖的 7.6 倍, 培养基中含蔗糖时未获得



图 1 培养基含葡萄糖冬虫夏草菌子实体

Fig. 1 Medium containing glucose *Ophiocordyceps sinensis* fruiting body

注: 上图为营养液中含葡萄糖的培养基中培养 9 个月的冬虫夏草菌子实体。Note: The fruit body of *Ophiocordyceps sinensis* was cultured in glucose medium in nutrient solution for 9 months.

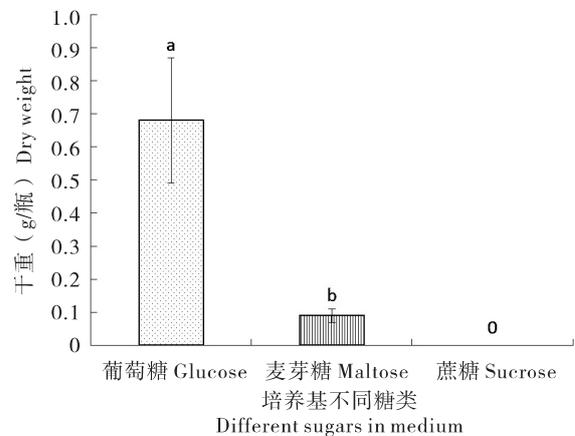


图 2 不同糖类培养基中冬虫夏草子实体干重差异

Fig. 2 The dry weight of *Ophiocordyceps sinensis* fruiting body was different in different sugar medium

注: 图为冬虫夏草菌在营养液中含有葡萄糖、麦芽糖、蔗糖的培养基中 4℃ 下培养 9 个月后子实体干重差异。柱图中不同字母表差异显著 ($P < 0.05$, T test)。Note: Dry weights of fruiting bodies (at 4℃ after 9 months) of *Ophiocordyceps sinensis* from the media containing glucose (A); maltose (B); sucrose (C). Bars with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$, T test).

任何子实体, 尽管出现大量气生菌丝。

2.3 植物生长调节剂对子实体培养的影响

加入环磷腺苷、三十烷醇和玉米素的培养瓶均未发现菌丝生长, 说明这些化合物强烈抑制冬

虫夏草菌的生长。加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6-苄氨基腺嘌呤的培养瓶可见菌丝生长, 但未见原基分化。

加有 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 赤霉素或 α -萘乙酸的培养瓶未长出菌丝, 但在加入浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均有菌丝长出, 似乎低浓度的赤霉素或 α -萘乙酸对冬虫夏草菌的生长具有抑制作用。2, 4-D 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 培养瓶中冬虫夏草菌均未长出菌丝, 但加入浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培养瓶中菌丝生长, 说明 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 2, 4-D 对冬虫夏草菌生长具有明显抑制作用, 但

1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度支持菌丝生长。

转入 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 6 个月后, 收获子实体。各处理间子实体干重数据单因素方差分析, 结果显示, 8 个不同种类和浓度的溶剂与对照均未见显著差异 ($df_1 = 7, df_2 = 112, F = 0.690, P = 0.681$) ($P > 0.05$) (图 3), 说明不同种类和浓度的溶剂对冬虫夏草子实体的生长未产生显著影响; 但是, 各处理间差异显著 ($df_1 = 10, df_2 = 153, F = 32.927, P = 0.000$) ($P < 0.05$) (图 4)。

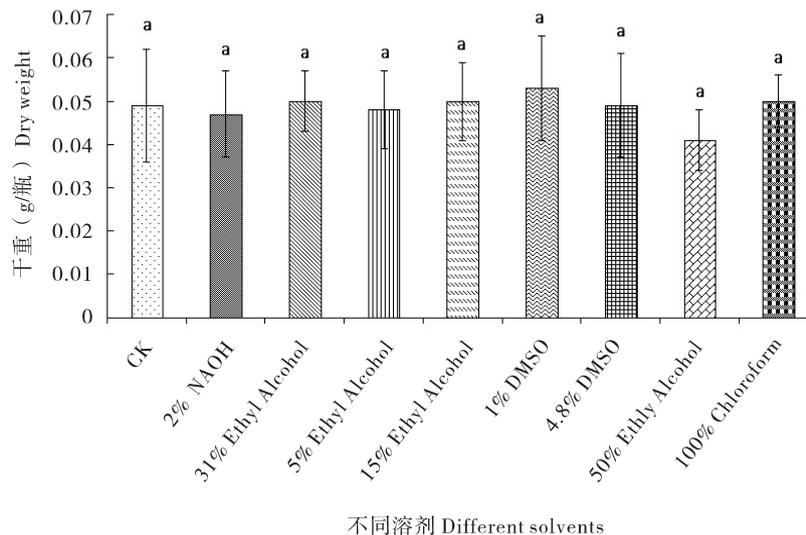


图 3 不同种类和浓度的溶剂对冬虫夏草子实体生长的影响

Fig. 3 Effects of different kinds and concentrations of solvents on the growth of *Ophiocordyceps sinensis* fruiting body
注: 不同种类和浓度的溶剂 (2% NaOH, 5%、15%、31% 和 50% 乙醇, 1%、4.8% DMSO, 100% 氯仿) 与对照 (未加入任何植物生长调节剂和溶剂) 培养瓶中冬虫夏草子实体的干重。柱图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Tukey test)。Note: Dry weights of fruiting bodies of *Ophiocordyceps sinensis* from the culture bottles containing different solvents (2% NaOH, 5%, 15%, 31% and 50% ethanol, 1%, 4.8% DMSO, 100% chloroform) and from the control (without any plant growth regulators or solvents). Bars with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$, Tukey test).

与对照相比, 加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吲哚乙酸, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吲哚丁酸, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 赤霉素, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 乙烯利, 以及 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2, 4-D 的培养瓶中子实体干重均显著提高 (图 4), 其中加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吲哚丁酸和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2, 4-D 的培养瓶的子实体产量是对照的 15 倍。加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 赤霉素, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 乙烯利以及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -NAA-2 的培养瓶子实体产量与对照的均没有显著差异。

可知吲哚乙酸在浓度范围为 1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 低浓度时对子实体产量具有抑制作用, 高浓度时具有促进作用。吲哚丁酸在测定浓度范围时均对冬虫夏草子实体产量具有促进作用 (加入

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的处理由于受到污染未获得数据)。当赤霉素和乙烯利浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时子实体产量最高。 α -萘乙酸在低浓度和高浓度都表现出抑制作用, 中间浓度未产生抑制和促进作用。加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2, 4-D 对子实体产量具有强烈的促进作用, 但浓度增加后产生抑制作用。

3 结论与讨论

本实验研究结果表明培养基营养液中加入不同糖类时冬虫夏草子实体干重葡萄糖 > 麦芽糖 > 蔗糖。各类糖如葡萄糖、麦芽糖和蔗糖等已广泛用于真菌或食用菌子实体的培养。不同真菌最佳

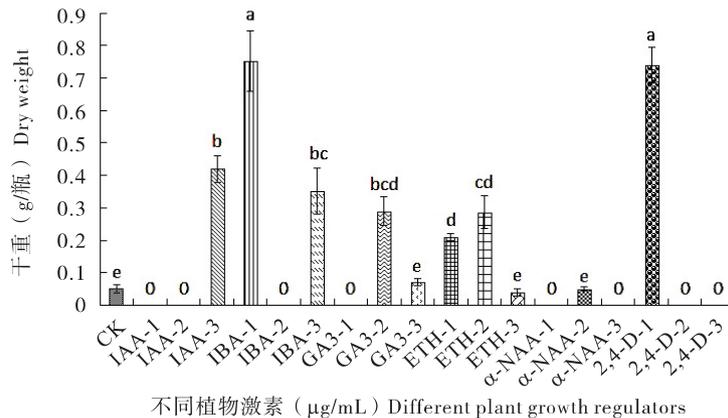


图4 不同植物激素种类和浓度对冬虫夏草子实体干重的影响

Fig. 4 Effects of different plant hormone types and concentrations on the dry weight of *Ophiocordyceps sinensis* fruit body
 注: 图为加入不同种类和浓度植物生长调节剂的培养基中冬虫夏草子实体干重的比较。IAA, 吲哚乙酸; IBA, 吲哚丁酸; GA, 赤霉素; ETH, 乙烯利; α-NAA, α-萘乙酸; 2,4-D, 2,4-二氯苯氧乙酸; CK, 对照 (未加入任何植物生长调节剂)。1, 2, 3 表示浓度 1 μg/mL, 10 μg/mL 和 100 μg/mL。柱图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Tukey test)。Note: Dry weights of fruiting bodies of *Ophiocordyceps sinensis* from the media containing different kinds and concentrations plant growth regulators at three concentrations. IAA, indole-3-acetic acid; IBA, indole-3-butyric acid; GA, gibberellin acid; α-NAA, α-Naphthalene acetic acid; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; CK, control (without any plant growth regulators). 1, 2, 3 indicate the concentrations of 1 μg/mL, 10 μg/mL or 100 μg/mL. Bars with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$, Tukey test).

糖源多样, 如桑黄菌 (蔗糖) (吴亚召等, 2014)、白灵菇 *Pleurotus nebrodensis* (可溶性淀粉) (李珍等, 2015)、双胞蘑菇 *Agaricus bisporus* (麦芽糖) (张健, 2016)、秀珍菇 *Pleurotus geesteranus* (麦芽糖) (李碧琼等, 2017)、鸡枞菌 *Termitomyces albuminosu* (蔗糖) (李艳丽, 2018) 和蛹虫草 *Cordyceps militaris* (蔗糖) (杨心如等, 2019)。显然, 这与真菌的糖代谢能力有关。本实验中, 加入葡萄糖的大米小麦培养基中冬虫夏草子实体的生长速率和干重显著优于麦芽糖培养基的。在液体培养基中, 麦芽糖比葡萄糖更有利于获得高产量的芽生孢子 (Liu *et al.*, 2019)。可能有利于芽生孢子生长的麦芽糖不利于大米小麦固体培养基中冬虫夏草子实体的形成。有趣的是, 与许多真菌不同, 蔗糖不利于冬虫夏草形成子实体, 尽管在培养基中出现大量气生菌丝。诱导冬虫夏草子实体形成的糖代谢通路值得进一步研究。

在本实验结果中 1 μg/mL IBA 和 2,4-D 对冬虫夏草菌子实体生长促进效果最佳。植物生长调节剂是包括人工合成的化合物和从生物中提取的天然植物激素, 用于有效调节作物生育过程, 达到稳产增产、改善品质、增强作物抗逆性等目的。科学研究表明, 植物生长调节剂的使用可使蔬果

产量增加 5% ~ 30% (朱杰丽等, 2013)。为避免食用过量, 世界各国均制定植物生长调节剂最大残留限量值规定, 如欧盟规定食用菌中多效唑、氯吡脞、抗倒酯、环丙酸酰胺的最大残留限量值 0.01 mg/kg, 日本规定食用菌中氯苯胺灵的最大残留限量值为 0.02 mg/kg; 我国和美国暂未有食用菌中植物生长调节剂的限量规定 (邱世婷等, 2019), 尽管在果蔬上具有残留限量标准 (朱杰丽等, 2013)。

各种植物生长调节剂对真菌子实体的作用不同, 如吲哚乙酸促进粉被虫草 *Cordyceps pruinosa* 子实体生成, 环磷腺苷 (cAMP) 增加鲜重 (徐莉等, 2008); 茉莉酸甲酯和吲哚乙酸能显著缩短猴头菇 *Hericium erinaceus* 的生长周期, 赤霉素、萘乙酸及吲哚乙酸能显著提高猴头菇的产量 (Thuan等, 2017)。本实验结果为利用安全的植物生长调节剂促进冬虫夏草子实体人工培育提供的思路。

参考文献 (References)

- Cao L, Han RC. A method for artificial cultivation of fruiting bodies of *Ophiocordyceps sinensis*: ZL201410289703. 0 [P]. 2015-05-20 [2019-12-09]. 曹莉, 韩日畴. 一种冬虫夏草子实体人工栽培方法: ZL201410289703. 0 [P]. 2015-05-20 [2019-12-09].
 Cao L, Ye YS, Han RC. Fruiting body production of the medicinal

- Chinese caterpillar mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes), in artificial medium [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2015, 17 (11): 1107–1112.
- Frick EM, Strader LC. Roles for IBA – derived auxin in plant development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69 (2): 169–177.
- Han RC, Wu H, Tao HP, et al. Research on Chinese cordyceps during the past 70 years in China [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2019, 56 (5): 849–883. [韩日畴, 吴华, 陶海平, 等. 中国冬虫夏草研发 70 年 [J]. *应用昆虫学报*, 2019, 56 (5): 849–883]
- He ZY, Li L, Zhang DL, et al. The research on the proliferative culture of *Ophiocordyceps sinensis* filamentous mycelium [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2016, 38 (6): 1205–1213. [贺宗毅, 李黎, 张德利, 等. 冬虫夏草菌丝状菌源增殖培养的研究 [J]. *环境昆虫学报*, 2016, 38 (6): 1205–1213]
- Li BQ, Chen ZM, Lin JY, et al. Study on the biological characteristics of *Pleurotus geesteranus* S3–45 strain [J]. *Edible Fungi of China*, 2017, 36 (2): 13–16. [李碧琼, 陈政明, 林俊扬, 等. 秀珍菇 S3–45 菌株生物学特性研究 [J]. *中国食用菌*, 2017, 36 (2): 13–16]
- Li CR, Peng F, Fan MZ, et al. studies on liquid and solid culture conditions of *Hirsutella sinensis* strain RCEF0273, the anamorph of *Cordyceps sinensis* [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2004, 4: 460–465. [李春如, 彭凡, 樊美珍, 等. 中国被毛孢 RCEF0273 培养工艺的研究 [J]. *安徽农业大学学报*, 2004, 4: 460–465]
- Li TT. Study on Mutation of *Cordyceps sinensis* and Liquid Fermentation of New Strain in New Medium with Rice Bran and Wheat Bran [D]. Jiangsu: Jiangsu University Master Thesis, 2017. [李婷婷. 冬虫夏草菌株诱变及新菌株液态发酵米糠麸皮全料新培养基的研究 [D]. 江苏: 江苏大学硕士论文, 2017]
- Li WJ, Dong CH, Liu XZ, et al. Research advances in artificial cultivation of Chinese cordyceps [J]. *Mycosystema*, 2016, 35 (4): 375–387. [李文佳, 董彩虹, 刘杏忠, 等. 冬虫夏草培植技术研究进展 [J]. *菌物学报*, 2016, 35 (4): 375–387]
- Li YL. Research on Optimization and Artificial Cultivation Technology of *Termitomyces albuminosus* Culture [D]. Shaanxi: Shaanxi University of Technology Master Thesis, 2018. [李艳丽. 鸡枞菌培养基优化及人工栽培技术研究 [D]. 陕西: 陕西理工大学硕士论文, 2018]
- Li Z, Lv PH, Du ST. Effect of different types of plants growth regulators hypha growth of *Grifola frondosa* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2016, 31 (2): 188–194. [李珍, 吕平会, 杜双田. 植物生长调节剂对灰树花 QY–01 菌丝生长的影响 [J]. *西北林学院学报*, 2016, 31 (2): 188–194]
- Li Z. Cultivation Key Technology of *Pleurotus nebrodensis* [D]. Shaanxi: Northwest A&F University Master Thesis, 2015. [李珍. 白灵菇栽培关键技术的研究 [D]. 陕西: 西北农林科技大学硕士论文, 2015]
- Liu X, Zhang Z, Xu H, et al. Optimization of liquid fermentation medium for *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2013, 35 (1): 14–16. [刘欣, 张宗豪, 徐海峰, 等. 冬虫夏草菌液体发酵培养基的优化研究 [J]. *食用菌*, 2013, 35 (1): 14–16]
- Lo H, Hsieh C, Lin F, et al. A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in DongChongXiaCao (冬虫夏草 *Dōng Chóng Xià Cǎo*) and related bioactive ingredients [J]. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2013, 3 (1): 16–32.
- Lu YH, Liang GH, Zhu ZG, et al. The solid fermentation of *Ophiocordyceps sinensis* strains isolated from different parts of specimen and different generations [J]. *Mycosystema*, 2016, 35 (4): 433–439. [吕延华, 梁关海, 朱志钢, 等. 冬虫夏草不同部位来源的菌株及多次传代固体发酵特性 [J]. *菌物学报*, 2016, 35 (4): 433–439]
- Ludwig-Müller J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 17 (2): 4–12.
- Mao XM, Zhao SM, Cao L, et al. The morphology observation of anamorph of *Ophiocordyceps sinensis* from different origins [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2013, 35 (3): 343–353. [毛雄民, 赵世明, 曹莉, 等. 不同产地冬虫夏草无性型的形态观察 [J]. *环境昆虫学报*, 2013, 35 (3): 343–353]
- MeiCY, Zhang Y, Mao XM, et al. The effects of culture parameters on the conidial germination and yields of *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 2013, 4 (4): 2141–2413.
- Qiu ST, Hou X, Dai XH. Determination of 23 kinds of plants growth regulators residus in *Auricularia cornea* Ehrenb. by modified QuEChERS method and ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10 (10): 2987–2996. [邱世婷, 侯雪, 代晓航. 改进的 QuEChERS – 超高效液相色谱 – 串联质谱法测定毛木耳中 23 种植物生长调节剂的残留量 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10 (10): 2987–2996]
- Qiu XH, Cao L, Han RC. The progress, issues and perspectives in the research of *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2016, 38 (1): 1–23. [丘雪红, 曹莉, 韩日畴. 冬虫夏草的研究进展、现存问题与研究展望 [J]. *环境昆虫学报*, 2016, 38 (1): 1–23]
- Thuan VM, Li X, Guo LQ, et al. Effects of inducers on growth and yield of *Hericium erinaceus* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38 (12): 77–80, 86. [Thuan VM, 李雄, 郭丽琼, 等. 诱导物对猴头菇子实体生长发育及产量的影响 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38 (12): 77–80, 86]
- Wang Z, Ma QL, Qiao ZQ (a). Isolation and culture of *Ophiocordyceps sinensis* in Gansu Province [J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2001, 7: 43–44. [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]
- Wang Z, Ma QL, Qiao ZQ, et al (b). Results of infection test in whole artificial culture of *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2001, 7: 40–41. [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]
- Wu YZ, Zhang WJ, Lei P, et al. Effects of different culture materials on growth of mycelia and fruiting body of Mulberry yellow [J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 60 (10): 6-8. [吴亚召, 张文隽, 雷萍, 等. 不同培养料配方对桑黄菌丝及子实体生长的影响 [J]. 陕西农业科学, 2014, 60 (10): 6-8]
- Xu L, Li CR, Rong YW, et al. Artificial culture of *Cordyceps pruinosa* with three kinds of plant hormones addition [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2008, 1: 80-83. [徐莉, 李春如, 荣跃文, 等. 3种植物激素对粉被虫草子实体形成的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 2008, 1: 80-83]
- Yang XR, Liu RX, Guo ZB, et al. Culture and experiment of *Cordyceps militaris* liquid strain with different carbon and nitrogen sources [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2019, 41 (3): 36-39. [杨心如, 刘瑞香, 郭占斌, 等. 不同碳氮源培养蛹虫草液体菌种及栽培试验 [J]. 食用菌, 2019, 41 (3): 36-39]
- Zhang HF. Study on conditions of culture on fruiting body of *Cordyceps militaris* [J]. *Journal of Jilin Medical College*, 2005, 4: 192-194. [张慧锋. 北冬虫夏草子实体培养条件的探索 [J]. 吉林医药学院学报, 2005, 4: 192-194]
- Zhang J. Identification and the Corresponding Fruiting Conditions and Mechanism of A Wild *Agaricus bisporus* [D]. Shanxi: Shanxi University Master Thesis, 2016. [张健. 一株野生双孢蘑菇的鉴定、形成子实体的条件和机理研究 [D]. 山西: 山西大学硕士论文, 2016]
- Zhou X, Li L, Tian E. Advances in research of the artificial cultivation of *Ophiocordyceps sinensis* in China [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2013, 34 (3): 233-243.
- Zhu JL, Yang L, Chai ZL, et al. Analysis of maximum permissible concentrations of plant growth regulators [J]. *Biological Disaster Science*, 2013, 36 (2): 232-236. [朱杰丽, 杨柳, 柴振林, 等. 国内外植物生长调节剂限量标准分析研究 [J]. 生物灾害科学, 2013, 36 (2): 232-236]