

# 矿质元素对北虫草继代培养不同 菌落子实体产量及菌丝生长速度的影响

何莉莉\* 韩成玲 范文丽 李佩亮 徐佳 耿丽娟

(沈阳农业大学园艺学院 辽宁省设施园艺重点实验室 设施园艺省部共建教育部重点实验室 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:** 主要研究矿质元素对北虫草继代培养中形成的不同类型菌落子实体产量及菌丝生长速度的影响, 旨在探讨矿质元素与子实体产量以及菌丝生长速度的关系。采用正交试验, 将北虫草优良菌株 L<sub>20</sub> 在不同矿质元素培养基上进行 12 次继代培养。结果表明菌株 L<sub>20</sub> 在不同培养基中继代培养后形成 7 种菌落类型, 有子实体形成能力的菌落为 I、II、III、V 型, 其中 I 型菌落产量最高、III 型中等、II 型最低, V 型形成的子实体均为畸形; IV、VI、VII 型无子实体形成能力。菌丝生长速度依次为 V 型 > IV 型 > VII 型 > VI 型 > III 型 > II 型 > I 型, 高产型菌落生长速度最慢, 而低产型菌落菌丝徒长, 表明菌落生长速度与子实体产量成负相关。优型菌落——I 型菌落子实体高产及高产保持代数最多的矿质元素配方为 K<sub>3</sub>Mg<sub>2</sub>Ca<sub>4</sub>Mn<sub>3</sub>Zn<sub>2</sub>, 其中 Mn 和 K 促进子实体高产, K、Mg、Ca 有利于高产保持多代。抑制 I 型菌落菌丝徒长的最佳配方为 K<sub>3</sub>Mg<sub>2</sub>Ca<sub>2</sub>Mn<sub>3</sub>Zn<sub>2</sub>, 其中 Mn 对其抑制作用最为显著。

**关键词:** 北虫草, 矿质元素, 子实体, 继代培养, 菌丝生长速度, 正交试验

## Effects of Mineral Elements on Fruit-body Yield and Mycelia Growth Rate of Different Colony Types of *Cordyceps militaris* in Subculturing

HE Li-Li\* HAN Cheng-Ling FAN Wen-Li LI Pei-Liang XU Jia GENG Li-Juan

(Key Laboratory of Protected Horticulture, Ministry of education, College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Key Laboratory of Protected of Liaoning province, Shenyang, Liaoning 110866, China)

**Abstract:** To elucidate the relationship among mineral elements, the yield of fruit-body and growth rate of mycelia, effects of mineral elements on the fruit-body yield and growth rate of mycelia of different colony types of *Cordyceps militaris* in subculturing were investigated. L<sub>20</sub>, a good strain, was subcultured on different mineral elements media for twelve times with orthogonal experimental method. The results showed that there were seven colony types of L<sub>20</sub> after subcultured, among which type I, II, III and V had ability to form fruit-body; however, type IV, VI and VII could not. Type I performed the highest yield of fruit-body, type II the lowest, and type III in mid-level; while all the fruit-body pro-

基金项目: 辽宁省攻关项目(No. 2006215001)

\* 通讯作者: Tel: 86-24-88487166; E-mail: hllsynd@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-03-19; 接受日期: 2010-06-08

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

duced by type V were deformity. The growth rate of mycelia of different colony types were as follow: type V > type IV > type VII > type VI > type III > type II > type I. The high-production colonies had slower growth rate of mycelia, while the low- production types had over growth of hyphae, indicating there was a negative correlation between the growth of mycelia and fruit-body yield. The formulation of mineral elements, which kept type I high yield and maintained more generations was  $K_3Mg_2Ca_4Mn_3Zn_2$ , of which Mn, and K were able to produce high yield of fruit-body; K, Mg and Ca could maintain more generations to produce high yield. The best formulation which suppressed excessive growth rate of mycelia of type I was  $K_3Mg_2Ca_2Mn_3Zn_2$ , and Mn had the most significant effect.

**Keywords:** *Cordyceps militaris*, Mineral elements, Fruit-body, Subculturing, Growth rate of mycelia, Orthogonal experimental

北虫草 *Cordyceps militaris* (L.ex.Fr.) Link 又名蛹虫草, 隶属于真菌界 Fungi、子囊菌门 Ascomycota、子囊菌纲 Ascomycetes、粪壳菌亚纲 Sordariomycetidae、肉座菌目 Hypocreales、麦角菌科 Clavicipitaceae、虫草属 *Cordyceps*<sup>[1]</sup>。北虫草含有多种活性物质, 如甾醇、腺苷、嘌呤、多糖、蛋白等<sup>[2]</sup>, 其食用和药用价值可与冬虫夏草媲美, 能有效地抑制肿瘤和病毒, 是冬虫夏草较为理想的代用品。但是北虫草在生产过程中易发生菌种退化现象, 直接影响北虫草的产量和品质<sup>[3-4]</sup>。矿质元素在食用菌生育中起着极为重要的作用, 其供给失调会导致菌体形态及其生理生化发生一系列改变, 因此研究北虫草的退化现象及其与矿质元素的关系具有重要意义。许多虫生真菌在继代培养时具有退化变异现象, 表现为菌落角变<sup>[5]</sup>、气生菌丝化<sup>[6]</sup>、子实体或分生孢子产生能力下降或丧失<sup>[7]</sup>、重要次生代谢物合成能力下降或丧失<sup>[8-10]</sup>、毒力衰退<sup>[11-12]</sup>等现象, 给真菌的工业化生产及应用带来重大损失。关于矿质元素在真菌方面也有较多研究, 相关研究认为培养基中加入 Ca、Zn 可明显控制凤尾菇试管内子实体的形成<sup>[13]</sup>; 而缺乏磷、钾、钙、镁及硫元素时, 平菇菌丝的干重受到不同程度影响<sup>[14]</sup>; 硫酸钙能促进杏鲍菇菌丝生长<sup>[15]</sup>, 硫酸镁和磷酸二氢钾能促进白灵侧耳和鲍鱼侧耳菌丝生长<sup>[16]</sup>; 钙能促进许多真菌的生长和繁殖<sup>[17]</sup>, 白腐真菌培养基缺乏微量元素则菌丝生长会受抑制<sup>[18]</sup>, 但这些研究局限于一代的研究, 关于矿质元素在真菌继代培养方面的研究较少。北虫草具有较高的应用价值, 在生产中要想获得更多的菌丝体和子实体必须进行继代培养, 而继代培养必然会伴随菌株性状的改变。目前国内外对北虫草继代培养过程中出现的退化现象研究较少, 有关营养的研究多数限于当代培养。本文旨在从继

代培养的角度来研究矿质元素对北虫草不同类型菌落子实体产量和菌丝生长速度的影响, 以及菌丝生长速度与子实体产量的关系, 探讨优型菌落高产的矿质元素配方, 为生产提供理论依据, 为后续研究提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

出发菌株: 北虫草菌株 L<sub>20</sub> (沈阳农业大学食用菌研究所提供)。

### 1.2 试验设计

矿质元素采用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)五因素四水平正交设计 (表 1), 对菌株 L<sub>20</sub> 进行 12 次继代培养, 当菌落发生角变时, 将角变区和非角变区分别继代培养。

表 1 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交试验因素水平表  
Table 1 Factors and levels of L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) orthogonal test

因素 Factors	水平 Level			
	1	2	3	4
K <sup>+</sup> (g/L)	0.00	0.50	1.00	1.50
Mg <sup>2+</sup> (g/L)	0.00	0.05	0.10	0.15
Ca <sup>2+</sup> (g/L)	0.00	0.02	0.04	0.06
Mn <sup>2+</sup> (μg/L)	0.00	10.00	20	30.00
Zn <sup>2+</sup> (μg/L)	0.00	125.00	250	375.00

### 1.3 培养基

原种扩大培养基: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 2 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L, VB<sub>1</sub> 10 mg/L, 琼脂 18-20 g/L。

液体培养基: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 2 g/L, VB<sub>1</sub> 10 mg/L, 矿质元素按表 1 添加, 共有 16 种不同的处理, 用于菌种的培养。

继代平板培养基: 在液体培养基的基础上添加琼脂 18-20 g/L, 矿质元素按表 1 添加, 共有 16 种不同的处理。

栽培培养基: 每瓶培养基中大米 25 g, VB<sub>1</sub> 0.35 mg, 水 30 mL。

1.4 继代培养

将供试菌株接种于原种扩大培养基平板中央, 用封口膜封口, 在 23℃ 下恒温培养至菌落直径约为 6 cm, 备用。为了提高准确性, 培养好的平板菌种取同一半径圆周上生长一致的菌丝, 用灭菌的 0.5 cm 直径的打孔器打出大小相等的菌块, 接种在  $d = 9$  cm 的平板培养基中央, 接种后在 23℃ 恒温遮光培养, 第 15 天起置于光照培养箱内培养 24 h。菌落出现角变时, 将角变区和非角变区分别继代培养, 共培养 12 代, 3 次重复。

1.5 子实体培养

将供试菌株接种到装有 40 mL 液体培养基的

三角瓶中, 静止 1 d 后放入振荡培养箱, 23℃、120 r/min 遮光培养 4–5 d, 制备成液体菌种。培养好的液体供试菌种接种于栽培培养基中, 进行子实体培养, 每个处理重复 3 次。按常规方法栽培管理, 子实体生长周期为 50 d, 子实体产量用鲜重表示。

1.6 调查项目

作者前期研究<sup>[19]</sup>表明, 出发菌株经继代培养后发生角变现象, 根据角变区分离菌株菌落的形态特征, 即菌落颜色、质地、菌丝气生性、菌丝疏密度, 将继代培养角变区分离菌株分为 7 种菌落类型(表 2)。

在菌丝培养期间每 2 d 测定菌丝生长速度, 观察菌丝生长的状况并记录。菌丝生长速度用菌落直径(mm/d)表示; 并且调查出发菌株及继代培养角变区分离菌株各代子实体产量。

表 2 菌株 L<sub>20</sub> 经不同矿质元素培养基继代培养后产生的菌落类型  
Table 2 The species of colony types of L<sub>20</sub> after subcultured in different mineral elements media

菌落类型 Colony types	菌落颜色 Colony color	菌落质地 Colony texture	菌丝气生性 Aerial hyphae	菌丝疏密 Hyphae closeness	有无角变 Sector	子实体产量(g/瓶) Fruit-body yield (g/bottle)
I	橘黄色 Saffron yellow	致密绒状, 有同心纹 Like dense floss with concentric circle	++	###	√	20.49 ± 0.1569Aa
II	橘黄色 Saffron yellow	絮状 Like batt	+++	#	√	15.08 ± 0.0318Cc
III	淡黄色 Primrose yellow	稀疏绒状, 有同心纹 Like sparse floss with concentric circle	+	#	√	17.40 ± 0.0419Bb
IV	白色 White	毡状 Like flet	++	###	×	无 No
V	淡黄色 Primrose yellow	稀疏绒状, 有辐射状褶皱 Like sparse floss radial folds	+	#	√	畸形 Abnormal
VI	白色 White	毡状, 菌丝有自溶现象 Like flet, Mycelial cells could self-phagocytosis	++	###	×	无 No
VII	黄绿色 Kelly	毡状 Like flet	++	###	×	无 No

注: +++、++和+: 菌丝气生性强、中和弱; ###、##和#: 菌丝密、中等、疏松; √: 菌落有角变; ×: 菌落无角变。  
Note: +++, ++ and +: The character aerial of hyphaeis strong, medium or weak; ###, ## and #: Hyphae are closeness, medium or loose; √: The strain have sector; ×: The strain have no sector.

1.7 数据分析

原始数据整理采用 Microsoft Excel (Office 2003)软件完成; 各类型菌落各代子实体产量和菌丝生长速度的多重比较(Duncan's)及正交试验数据分析采用 DPSv 7.05 软件完成。

2 结果与分析

2.1 矿质元素对不同类型菌落继代培养子实体产量的影响

对继代培养中形成的各类型菌落子实体产量进

行测定, 结果表明, I、II、III、V型可形成子实体; IV、VI、VII型无子实体形成能力; V型形成子实体为畸形。表 3 为不同类型菌落各代子实体产量, 表明 I、II、III型菌落之间子实体平均产量均达极显著差异( $P < 0.01$ ), 其中 I 型菌落子实体产量最高, 平均产量达(20.49 g/瓶); III型菌落产量中等, 平均产量为(17.40 g/瓶); II型菌落产量最低, 平均产量为(15.08 g/瓶)。不同培养世代各类型菌落子实体产量差异较大, I 型菌落子实体产量从初代开始逐渐增加, 到第 5 代时产量达到最高值(28.3 g/瓶), 极显著

高于其他世代, 而从第 8 代开始产量极显著降低, 产量较高时期主要集中在 3-7 代, 因此, 对 I 型菌落初代子实体产量及 3-7 代平均产量进行了正交分析; 并以 20 g 为高产标准, 对高产保持代数进行了正交分析; II 型菌落 1-5 代子实体产量较高, 从第 6 代开始逐渐下降, 作者前期研究<sup>[20]</sup>表明 II 型菌落极其不稳定, 在出现后持续 2-3 代即变异为其他类型的菌落, 并且 II 型菌落产量主要集中在 2-4 代, 因此对 II 型菌落 2-4 代平均产量进行了正交分析。由于 I 型菌落产量最高, II 型菌落产量最低, 因此仅对 I、II 型菌落进行了正交分析。

**2.1.1 矿质元素对 I 型菌落子实体产量的影响:** 表 4 为矿质元素对 I 型菌落初代及高产世代子实体产量影响的正交试验分析结果, 并进行了方差分析。结果表明 5 种矿质元素对 I 型菌落初代及高产世代子实体产量的影响均达到极显著水平。初代: 子实体产量最高的矿质元素组合为  $K_2Mg_2Ca_3Mn_3Zn_2$ , 即 K (0.5 g/L)、Mg (0.05 g/L)、Ca (0.04 g/L)、Mn (20  $\mu$ g/L)、Zn (125  $\mu$ g/L); 从极差 R 值可以看出, 各因素对 I 型菌落初代子实体产量影响程度的主次关系为  $K > Ca > Mn > Mg > Zn$ ; 试验结果表明, K 对 I 型菌落初代产量影响最大, 其次为 Ca、Mn、Mg, 影响最小的为 Zn。高产世代: 子实体产量最高的矿

质元素组合为  $K_3Mg_2Ca_4Mn_3Zn_2$ , 即 K (1.0 g/L)、Mg (0.05 g/L)、Ca (0.06 g/L)、Mn (20  $\mu$ g/L)、Zn (125  $\mu$ g/L); 从极差 R 值可以看出, 各因素对 I 型菌落继代培养子实体产量影响程度的主次关系为  $Mn > K > Zn > Ca > Mg$ , 结果表明对于高产世代 3-7 代, Mn、K 对子实体产量的影响最大, 其次为 Zn、Ca, 影响最小的为 Mg。

初代和高产世代子实体产量分析结果表明, 二者产量最高的组合和元素的影响程度并不一致, 这是因为在初世代菌株对环境的适应能力还不稳定。

以产量超过 20 g 为高产标准, 对 I 型菌落在不同培养基上高产保持代数进行正交分析和方差分析结果(表 5)表明, Mn 对 I 型菌落高产保持代数的影响达显著水平, 而其他矿质元素对 I 型菌落高产保持代数的影响均达到极显著水平。高产保持代数最多的矿质元素组合为  $K_3Mg_2Ca_4Mn_3Zn_2$ , 即 K (1.0 g/L)、Mg (0.05 g/L)、Ca (0.06 g/L)、Mn (20  $\mu$ g/L)、Zn (125  $\mu$ g/L), 与高产世代子实体产量最高的组合基本一致; 从极差 R 值可以看出, 各因素对 I 型菌落高产保持代数影响程度的主次关系为  $K > Mg > Ca > Zn > Mn$ 。试验结果表明 K、Mg、Ca 能使 I 型菌落子实体产量较高的代代保持较长, 其次为 Zn 影响最小为 Mn。

表 3 各类型菌落各代子实体产量(g 鲜重/瓶) Table 3 The fresh yield of fruit-body of different colony types in different generations			
继代培养次数 Generations	菌落类型 Colony types		
	I	II	III
1	19.32 ± 0.0438Dde	16.23 ± 0.2562ABab	19.02 ± 0.2494BCb
2	19.94 ± 0.2776Dcd	17.18 ± 0.1266Aa	19.25 ± 0.1094BCb
3	22.79 ± 0.2039Bbc	17.07 ± 0.1184Aa	21.61 ± 0.1863Aa
4	23.96 ± 0.4666Bb	15.40 ± 0.0803ABCbcd	20.56 ± 0.1516ABa
5	28.30 ± 0.8537Aa	15.51 ± 0.2217ABCbc	21.50 ± 1.1895Aa
6	22.63 ± 0.1920Bbc	15.21 ± 0.4328BCbcd	19.18 ± 0.1257BCb
7	21.97 ± 0.1134BCc	15.11 ± 0.3551BCbcd	18.24 ± 0.0760CDbc
8	19.98 ± 0.6331CDd	14.77 ± 0.3964BCDcd	17.00 ± 0.1075Dc
9	18.94 ± 0.4779CDd	14.10 ± 0.4433CDde	14.51 ± 0.1111Ed
10	17.68 ± 0.4032DEef	13.28 ± 0.7150DEe	14.06 ± 0.2353Ede
11	16.07 ± 1.1643EFf	12.01 ± 0.7731Ef	13.00 ± 0.2494Ee
12	14.32 ± 0.6742Fg		10.89 ± 0.7348Ff
均值 Means	20.49 ± 0.1569Aa	15.08 ± 0.0318Cc	17.40 ± 0.0419Bb

注: 不同大写字母为差异极显著, 不同小写字母为差异显著, 菌落各代之间比较参见列, 不同类型菌落均值之间比较参见行。下同。  
Note: Duncan's test. The same capital or small letter indicated significance at  $\alpha = 0.01$  or  $\alpha = 0.05$  level, Colony comparison among generations see the column, Comparison among means of different colony types see the line. The same below.

表 4 I 型菌落在不同培养基中初代及高产世代(3-7 代)子实体产量的正交试验结果与分析  
Table 4 The L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) orthogonal experiment results and analysis of fruit-body of type I in No. 1 generation and high yield generations (No. 3-7) in different mineral elements media

处理号 No.	因素 Factors					子实体鲜重(g/瓶) The fresh yield of fruit-body (g/bottle)					
	K	Mg	Ca	Mn	Zn	初代 No. 1 generation			高产世代 3-7 代 High yield generations (No. 3-7)		
						X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.34	19.41	19.00	20.72	20.16	20.68
2	0.00	0.05	0.02	10.00	125.00	22.79	22.18	23.70	21.82	22.26	21.61
3	0.00	0.10	0.04	20.00	250.00	23.01	22.49	21.55	21.06	20.64	21.71
4	0.00	0.15	0.06	30.00	375.00	20.84	21.59	20.42	22.04	22.53	22.86
5	0.50	0.00	0.02	20.00	375.00	22.18	23.19	21.47	23.89	24.80	24.04
6	0.50	0.05	0.00	30.00	250.00	18.64	17.55	20.06	20.30	20.31	21.54
7	0.50	0.10	0.06	0.00	125.00	21.84	20.65	22.43	23.25	23.76	23.96
8	0.50	0.15	0.04	10.00	0.00	25.31	24.87	25.00	16.68	16.74	16.85
9	1.00	0.00	0.04	30.00	125.00	17.14	18.51	17.54	23.46	24.21	24.03
10	1.00	0.05	0.06	20.00	0.00	20.92	19.87	22.00	24.94	25.43	25.36
11	1.00	0.10	0.00	10.00	375.00	12.37	13.54	10.84	23.16	23.79	24.13
12	1.00	0.15	0.02	0.00	250.00	15.92	16.97	15.32	23.46	23.12	24.08
13	1.50	0.00	0.06	10.00	250.00	16.84	17.55	18.32	22.08	22.65	23.08
14	1.50	0.05	0.04	0.00	375.00	21.74	20.36	19.67	23.49	24.05	24.20
15	1.50	0.10	0.02	30.00	0.00	12.43	11.96	11.52	21.11	20.90	21.79
16	1.50	0.15	0.00	20.00	125.00	19.02	18.44	19.06	25.16	25.11	24.92
初代 No. 1 generation	T1	256.32	230.49	207.27	232.65	231.63					
	T2	263.19	249.48	219.63	233.31	243.30					
	T3	200.94	204.63	257.19	253.20	224.22					
	T4	206.91	242.76	243.27	208.20	228.21					
	R	62.25	44.85	49.92	45.00	19.08					
高产世代 High yield generations	T1	258.09	273.81	269.98	274.93	251.37					
	T2	256.12	275.31	272.87	254.85	283.56					
	T3	289.18	269.26	257.13	287.07	264.03					
	T4	278.55	263.55	281.96	265.08	282.99					
	R	31.09	14.38	24.84	36.34	27.49					

注: X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 分别代表 3 次重复; T 代表每个因素试验结果的总和, 如 T1 代表每个因素第一水平的试验结果总和, 此处为 3 次重复的总和; R 值代表极差, 其大小反映因素对指标的影响程度。下同。

Note: X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> indicate three repeats. T indicates the sum of the results of each factor. For example, T1 means the sum of the results of the first factor, here is the sum of three repeats. R represents range, which numerical value reflects the effect degree of factors on the index. The same below.

综上所述, 得出 I 型菌落子实体高产及高产保持代数最多的矿质元素组合为 K (1.0 g/L)、Mg (0.05 g/L)、Ca (0.06 g/L)、Mn (20 μg/L)、Zn (125 μg/L)。从元素的影响程度来看, 对产量影响最大的为 Mn 和 K, 对高产保持代数影响最大的为 K、Mg、Ca。

**2.1.2 矿质元素对 II 型菌落子实体产量的影响:** 表 6 为矿质元素对 II 型菌落 2-4 代子实体产量影响的正交试验分析结果, 并对其进行方差分析。结果表

明, 各因素对 II 型菌落 2-4 代子实体平均产量的影响均达到极显著水平。子实体产量最高的矿质元素组合为 K<sub>2</sub>Mg<sub>4</sub>Ca<sub>4</sub>Mn<sub>1</sub>Zn<sub>4</sub>, 即 K (0.5 g/L)、Mg (0.15 g/L)、Ca (0.06 g/L)、Mn (0)、Zn (375 μg/L)。极差分析结果表明, 各因素对 II 型菌落 2-4 代子实体产量影响程度主次关系依次为: Zn > Ca > Mn > K > Mg。试验结果表明, Zn、Ca 对 II 型菌落 2-4 代子实体产量影响最大, 其次为 Mn、K, 而 Mg 的影响最小, 其中 Mn 起抑制作用。

表 5 I 型菌落在不同培养基中高产保持代数的正交试验结果与分析								
Table 5 The L <sub>16</sub> (4 <sup>5</sup> ) orthogonal experiment results and analysis of maintaining generations of high yield of type I in different mineral elements media								
处理号 No.	因素 Factors					子实体鲜重(g/瓶) The fresh yield of fruit-body (g/bottle)		
	K	Mg	Ca	Mn	Zn	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5	4	4
2	0.00	0.05	0.02	10.00	125.00	7	6	7
3	0.00	0.10	0.04	20.00	250.00	5	5	6
4	0.00	0.15	0.06	30.00	375.00	6	6	6
5	0.50	0.00	0.02	20.00	375.00	3	3	4
6	0.50	0.05	0.00	30.00	250.00	5	5	6
7	0.50	0.10	0.06	0.00	125.00	7	7	7
8	0.50	0.15	0.04	10.00	0.00	3	2	3
9	1.00	0.00	0.04	30.00	125.00	7	8	7
10	1.00	0.05	0.06	20.00	0.00	11	11	11
11	1.00	0.10	0.00	10.00	375.00	6	6	8
12	1.00	0.15	0.02	0.00	250.00	5	5	5
13	1.50	0.00	0.06	10.00	250.00	4	4	4
14	1.50	0.05	0.04	0.00	375.00	7	8	7
15	1.50	0.10	0.02	30.00	0.00	3	3	3
16	1.50	0.15	0.00	20.00	125.00	6	6	6
T1	62	57	67	71	63			
T2	55	91	54	60	81			
T3	90	61	63	72	54			
T4	61	59	84	65	70			
R	35	34	30	12	27			

综上所述,比较矿质元素对 I 型菌落与 II 型菌落子实体产量的影响,其中 K、Mg、Mn 促进了 I 型菌落子实体的形成及高产和保持较多的代数。Zn、Ca 促进 II 型菌落子实体的形成,而 Mn 对 II 型菌落子实体的形成起到抑制作用。

2.2 矿质元素对各类型菌落菌丝生长速度的影响

为了研究矿质元素、菌落类型、培养代数与菌丝生长速度的关系,本试验对菌株 L<sub>20</sub> 继代培养中形成的各类型菌落各代菌丝生长速度进行测定,结果(表 7)表明,不同培养世代菌落生长速度存在差异,I 型菌落在 1-5 代菌丝生长速度较为适宜,6 代之后菌丝生长速度极显著增快;II 型菌落在 2-4 代菌丝生长速度较为适宜,第 5 代开始菌丝徒长;其他类型菌落亦在继代培养的最初几代菌丝生长速度较慢,而在中后代菌丝生长速度较快。各类型菌落生长速度也有所不同,生长速度依次为 V > IV > VII > VI > III > II > I, I 型菌落菌丝生长速度较为缓慢( $\varphi = 4.576$  mm/d),而其他类型菌落生长速度较快,

V 型菌落生长速度最快( $\varphi = 5.067$  mm/d),其中 I 型菌落与 IV 和 V 型菌之间差异极显著( $P < 0.01$ ),而与其他类型菌落之间差异不显著( $P > 0.05$ );其他类型菌落之间菌丝生长速度差异不显著( $P > 0.05$ )。表明退化菌落及变异菌落菌丝具有徒长现象,说明菌丝生长速度过快或较慢都不利于子实体的形成和生长发育。

因此,以菌丝生速度较慢、不易徒长为原则,对 I、II 型菌丝生长速度进行了正交分析,其中对 I 型菌落分析了初代生长速度及高产世代 3-7 代菌丝生长速度,对 II 型菌落分析了高产世代 2-4 代平均生长速度。

2.2.1 矿质元素对 I 型菌落菌丝生长速度的影响:

表 8 为矿质元素对 I 型菌落初代及高产世代(3-7 代)菌丝生长速度影响的正交试验结果,并对其进行了方差分析。5 种矿质元素对 I 型菌落初代菌丝生长速度的影响均达到极显著水平。初代:菌丝生速度较慢、不易徒长的矿质元素组合为 K<sub>2</sub>Mg<sub>2</sub>Ca<sub>2</sub>Mn<sub>3</sub>Zn<sub>2</sub>,

表 6 II 型菌落在不同培养基中 2-4 子实体产量的正交试验结果与分析

Table 6 The L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) orthogonal experiment results and analysis of fruit-body of type II in No. 3-7 generations in different mineral elements media

处理号 No.	因素 Factors					子实体鲜重(g/瓶) The fresh yield of fruit-body (g/bottle)		
	K	Mg	Ca	Mn	Zn	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	14.21	14.45	13.16
2	0.00	0.05	0.02	10.00	125.00	13.74	14.28	14.58
3	0.00	0.10	0.04	20.00	250.00	15.41	14.79	15.41
4	0.00	0.15	0.06	30.00	375.00	17.74	18.19	17.60
5	0.50	0.00	0.02	20.00	375.00	18.09	18.52	18.57
6	0.50	0.05	0.00	30.00	250.00	15.75	15.51	15.18
7	0.50	0.10	0.06	0.00	125.00	19.21	20.32	19.20
8	0.50	0.15	0.04	10.00	0.00	16.57	16.08	16.12
9	1.00	0.00	0.04	30.00	125.00	15.61	16.55	15.42
10	1.00	0.05	0.06	20.00	0.00	14.87	14.20	14.50
11	1.00	0.10	0.00	10.00	375.00	16.23	15.93	16.68
12	1.00	0.15	0.02	0.00	250.00	18.86	18.42	18.82
13	1.50	0.00	0.06	10.00	250.00	19.30	18.99	19.92
14	1.50	0.05	0.04	0.00	375.00	19.73	19.55	19.37
15	1.50	0.10	0.02	30.00	0.00	13.96	14.80	14.76
16	1.50	0.15	0.00	20.00	125.00	14.87	14.68	15.64
T1	183.57	202.79	182.30	215.30	177.67			
T2	209.11	191.26	197.40	198.41	194.11			
T3	196.09	196.70	200.60	189.56	206.36			
T4	205.58	203.60	214.05	191.08	216.21			
R	25.54	12.34	31.75	25.74	38.54			

表 7 各类型菌落各代菌丝生长速度(单位: mm/d)

Table 7 The growth rate of mycelia of different colony types in different generations (mm/d)

继代培养次数 Generations	菌落类型 Colony types						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
1	4.08 ± 0.0091Gh	4.33 ± 0.0376Ff	4.52 ± 0.0015Gh				
2	4.06 ± 0.0166Gh	4.61 ± 0.0188Ee	4.61 ± 0.0068Fg	5.01 ± 0.0900Aa			
3	4.27 ± 0.0011Fg	4.75 ± 0.0083DEd	4.94 ± 0.0221BCDcd	5.02 ± 0.0473Aa	4.69 ± 0.1290De		
4	4.37 ± 0.0091Ff	4.97 ± 0.0058ABCb	4.85 ± 0.0072Ef	5.06 ± 0.0473Aa	4.84 ± 0.1464CDde	4.81 ± 0.0321BCbc	
5	4.55 ± 0.0209Ee	4.92 ± 0.0425BCDbc	4.96 ± 0.0190BCbc	4.99 ± 0.1250Aa	4.84 ± 0.0781CDde	4.64 ± 0.0635Cc	
6	4.52 ± 0.0080Ee	4.95 ± 0.0235BCbc	5.08 ± 0.0054Aa	4.94 ± 0.0985Aa	5.24 ± 0.1102ABCabc	4.93 ± 0.0400Bb	4.99 ± 0.0917Aabc
7	4.68 ± 0.0028Dd	4.91 ± 0.0205BCDbc	5.05 ± 0.0147Aa	5.05 ± 0.0213Aa	5.46 ± 0.0611Aa	4.93 ± 0.0723Bb	4.86 ± 0.0265Abc
8	4.80 ± 0.0075BCc	4.92 ± 0.0161BCDbc	4.98 ± 0.0069Bb	4.91 ± 0.0700Aa	5.04 ± 0.0310BCDcd	4.97 ± 0.1041Bb	4.88 ± 0.0208Aabc
9	4.72 ± 0.0142CDd	4.84 ± 0.01CDcd	5.06 ± 0.0265Aa	4.95 ± 0.0326Aa	4.85 ± 0.0462BCDde	4.94 ± 0.0436Bb	4.83 ± 0.0603Ac
10	4.90 ± 0.0799Bb	5.03 ± 0.052ABab	4.91 ± 0.0083CDde	4.93 ± 0.0447Aa	5.13 ± 0.0954ABCbcd	4.88 ± 0.0252BCb	5.03 ± 0.0551Aabc
11	4.90 ± 0.0140Bb	5.12 ± 0.0944Aa	4.89 ± 0.0089DEe	5.06 ± 0.0706Aa	5.18 ± 0.1058ABCabc	5.26 ± 0.0917Aa	5.06 ± 0.0819Aab
12	5.06 ± 0.0065Aa		5.07 ± 0.0162Aa	5.13 ± 0.0513Aa	5.4 ± 0.0451ABab	4.95 ± 0.0513Bb	5.09 ± 0.0889Aa
均值 Means	4.58 ± 0.0042Bb	4.85 ± 0.0458ABa	4.91 ± 0.0181ABa	5.01 ± 0.1528Aa	5.07 ± 0.3019Aa	4.92 ± 0.1773ABa	4.96 ± 0.1110ABa

即 K (0.5 g/L)、Mg (0.15 g/L)、Ca (0.02 g/L)、Mn (20 μg/L)、Zn (125 μg/L); 从极差 *R* 值可以看出, 各因素对 I 型菌丝生长速度影响程度的主次关系为 Mn > Ca > Mg > Zn > K; 试验结果表明, 对初代而言, Mn 对菌丝生长速度影响较大; 其次为 Ca、Mg、Zn; K 的影响最小。高产世代: 菌丝生速度较慢、不易徒长的矿质元素组合为 K<sub>3</sub>Mg<sub>2</sub>Ca<sub>2</sub>Mn<sub>3</sub>Zn<sub>2</sub>, 即 K (1.0 g/L)、Mg (0.15 g/L)、Ca (0.02 g/L)、Mn (20 μg/L)、Zn (125 μg/L); 各因素对 I 型菌落高产世代 3-7 代菌丝生长速度影响程度的主次关系为 Mn > Zn > Ca > Mg > K; 试验结果表明对于高产世代 3-7 代菌丝生长速度, Mn 对其影响最大, 其次为

Zn、Ca、Mg、K 的影响较小。  
综上所述, 对于 I 型菌落, 菌丝生速度较慢、不易徒长的组合 K (1.0 g/L)、Mg (0.15 g/L)、Ca (0.02 g/L)、Mn (20 μg/L)、Zn (125 μg/L), 其中 Mn 的影响最大, K 的影响较小。与子实体产量相比, K、Mg、Zn、Mn 的浓度水平与子实体产量最高的组合一致。  
**2.2.2 矿质元素对 II 型菌落菌丝生长速度的影响:** 表 9 为矿质元素对 II 型菌落 2-4 代菌丝生长速度影响的正交试验分析结果, 并进行了方差分析。结果表明, 各因素对 II 型菌落 2-4 代菌丝生长速度的影响均达到极显著水平。菌丝生长速度较慢、不易

表 8 I 型菌落在不同培养基中初代及高产世代(3-7 代)菌丝生长速度的正交试验结果与分析 Table 8 The L <sub>16</sub> (4 <sup>5</sup> ) orthogonal experiment results and analysis of mycelia growth rate in No. 1 generation and high yield generations (No. 3-7) in different mineral elements media											
处理号 No.	因素 Factors					菌丝生长速度 The growth rate of mycelia (mm/d)					
	K	Mg	Ca	Mn	Zn	初代 No. 1 generation			高产世代 3-7 代 High yield generations (No. 3-7)		
						X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.03	3.95	3.87	4.21	4.21	4.24
2	0.00	0.05	0.02	10.00	125.00	3.88	3.88	3.88	4.03	4.14	4.14
3	0.00	0.10	0.04	20.00	250.00	4.06	4.06	4.06	4.62	4.60	4.60
4	0.00	0.15	0.06	30.00	375.00	4.56	4.63	4.50	4.67	4.70	4.69
5	0.50	0.00	0.02	20.00	375.00	3.65	3.58	3.39	4.23	4.28	4.25
6	0.50	0.05	0.00	30.00	250.00	3.97	3.88	3.91	4.63	4.67	4.68
7	0.50	0.10	0.06	0.00	125.00	3.94	3.90	3.83	4.49	4.51	4.55
8	0.50	0.15	0.04	10.00	0.00	4.38	4.50	4.63	4.97	4.93	4.97
9	1.00	0.00	0.04	30.00	125.00	4.06	3.94	4.06	4.44	4.50	4.51
10	1.00	0.05	0.06	20.00	0.00	3.75	3.81	3.63	4.10	4.06	4.10
11	1.00	0.10	0.00	10.00	375.00	4.25	4.38	4.21	4.38	4.41	4.48
12	1.00	0.15	0.02	0.00	250.00	4.21	4.07	4.29	4.60	4.62	4.63
13	1.50	0.00	0.06	10.00	250.00	4.44	4.50	4.44	4.63	4.64	4.70
14	1.50	0.05	0.04	0.00	375.00	4.39	4.45	4.21	4.54	4.59	4.66
15	1.50	0.10	0.02	30.00	0.00	4.09	4.08	4.07	4.53	4.58	4.56
16	1.50	0.15	0.00	20.00	125.00	3.89	3.88	3.82	4.18	4.27	4.25
初代 No.1 generation	T1	49.35	47.91	48.03	49.13	48.78					
	T2	47.54	47.62	47.04	51.34	46.93					
	T3	48.64	48.93	50.79	45.58	49.89					
	T4	50.25	51.33	49.93	49.74	50.19					
	R	2.71	3.71	3.75	5.77	3.26					
高产世代 High yield generations	T1	52.85	52.81	52.61	53.85	53.44					
	T2	55.14	52.34	52.56	54.40	52.01					
	T3	52.82	54.31	55.91	51.53	55.60					
	T4	54.11	55.46	53.83	55.13	53.87					
	R	2.32	3.13	3.35	3.60	3.59					



徒长的矿质元素组合为  $K_2Mg_4Ca_3Mn_1Zn_4$ , 即 K (1.0 g/L)、Mg (0.15 g/L)、Ca (0.02 g/L)、Mn (20  $\mu$ g/L)、Zn (125  $\mu$ g/L)。极差分析结果表明, 各因素对 II 型菌落 2-4 代菌丝生长速度影响程度主次关系为  $Zn > K > Mn > Ca > Mg$ 。试验结果表明抑制 II 型菌落 2-4 代菌丝徒长最为显著的元素为 Zn、K、

其次为 Mn、Ca, Mg 的影响最小, 其中 Mn 能促进菌丝徒长。

比较矿质元素对 I 型菌落与 II 型菌落的影响, Mn 对 I 型菌落菌丝徒长的抑制作用最大, K 最小; 而对于 II 型菌落, 抑制作用最大的为 Zn 和 K, 最小的为 Mg, 而 Mn 促进 II 型菌落菌丝的徒长。

表 9 II 型菌落在不同培养基中 2-4 菌丝生长速度的正交试验结果与分析  
Table 9 The  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experiment results and analysis of mycelia growth rate of type II in No. 2-4 generations in different mineral elements media

处理号 No.	因素 Factors					菌丝生长速度 The growth rate of mycelia (mm/d)		
	K	Mg	Ca	Mn	Zn	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.89	4.89	4.88
2	0.00	0.05	0.02	10.00	125.00	5.29	5.39	5.27
3	0.00	0.10	0.04	20.00	250.00	4.77	4.88	4.68
4	0.00	0.15	0.06	30.00	375.00	4.41	4.42	4.53
5	0.50	0.00	0.02	20.00	375.00	4.19	4.21	4.33
6	0.50	0.05	0.00	30.00	250.00	4.69	4.88	4.80
7	0.50	0.10	0.06	0.00	125.00	4.60	4.56	4.53
8	0.50	0.15	0.04	10.00	0.00	4.44	4.51	4.48
9	1.00	0.00	0.04	30.00	125.00	5.11	5.14	4.91
10	1.00	0.05	0.06	20.00	0.00	5.09	5.08	5.16
11	1.00	0.10	0.00	10.00	375.00	5.12	5.27	5.12
12	1.00	0.15	0.02	0.00	250.00	4.66	4.67	4.68
13	1.50	0.00	0.06	10.00	250.00	5.02	5.04	5.00
14	1.50	0.05	0.04	0.00	375.00	4.10	4.11	4.06
15	1.50	0.10	0.02	30.00	0.00	5.05	5.03	5.08
16	1.50	0.15	0.00	20.00	125.00	5.01	5.31	4.83
T1	58.29	57.60	59.68	54.60	58.57			
T2	54.21	57.92	57.84	59.95	59.94			
T3	60.00	58.67	55.17	57.53	57.74			
T4	57.63	55.95	57.44	58.06	53.88			
R	5.79	2.73	4.51	5.35	6.06			

3 讨论

作者前期研究<sup>[19]</sup>结果表明菌株  $L_{20}$  经 12 次继代后在不同矿质元素培养基上可发生明显的角变现象, 形成 7 种不同的菌落类型, 这可能是因为菌株在培养中发生了异核体的分化<sup>[4]</sup>。通过对不同形态菌落子实体产量分析, 结果表明 I、II、III、V 型可形成子实体; IV、VI、VII 型无子实体形成能力; 其中 I 型菌落产量最高、III 型中等、II 型最低, V 型形成子实体均为畸形; 这一现象说明菌落类型是决定子实体产量的重要指标, 与刘狄<sup>[3]</sup>研究结果一致。

试验结果表明矿质元素对不同类型菌株子实体产量的影响不同。I 型菌落子实体高产及高产保持代数最长的矿质元素组合为  $K_3Mg_2Ca_4Mn_3Zn_2$ , 其中对高产影响最大的为 Mn 和 K, 对高产保持代数影响最大的为 Mg 和 K。II 型菌落子实体产量最高的矿质元素组合为  $K_2Mg_4Ca_4Mn_1Zn_4$ , Zn、Ca 促进其子实体的形成, 而 Mn 对其起到抑制作用。I 型高产最优组合中, Ca 在 4 水平(0.06 g/L)下产量最高, 在大于 0.06 g/L 水平下是否还有增产的潜力有待进一步研究。

对继代培养中形成的不同类型菌落生长速度进

行研究,结果表明,角变区菌丝除了菌落形态与原始菌落不同外,其生长速度也表现出一定的徒长趋势,菌丝生长速度依次为  $V > IV > VII > VI > III > II > I$ ,高产型菌落 I 型生长速度最慢,而低产型菌落菌丝徒长,表明菌落生长速度较慢,不易徒长的菌落子实体产量较高。作者前期研究<sup>[20]</sup>发现 I 型菌落保持代数最长,表明生长速度较慢的菌落,保持代数较长,子实体产量较高。I 型菌落菌丝生长速度较慢、不易徒长的组合为  $K_3Mg_2Ca_2Mn_3Zn_2$ , Mn 对 I 型菌落菌丝徒长的抑制作用最大;而对于 II 型菌落,菌丝生长速度较慢、不易徒长的矿质元素组合为  $K_2Mg_4Ca_3Mn_1Zn_4$ ,抑制作用最大的为 Zn 和 K,最小的为 Mg,而 Mn 促进 II 型菌落菌丝的徒长。这说明 Mn 对 I 型菌落、Zn 对 II 型菌落子实体高产的促进作用主要是因为它们能抑制菌丝徒长;而 Mn 对 II 型菌落子实体高产的抑制作用主要是因为 Mn 能加速 II 型菌落菌丝徒长。

综上所述,菌落类型、菌丝生长速度与菌落保持代数和子实体高产相关,菌落颜色较深呈橘黄色、菌丝气生性中等、菌丝生长速度较慢的菌落类型保持代数较长,子实体产量较高,其中 I 型菌落具有此类特征,属于优型菌落型。I 型菌落子实体高产及高产保持代数最多的矿质元素组合为 K (1.0 g/L)、Mg (0.05 g/L)、Ca (0.06 g/L)、Mn (20  $\mu$ g/L)、Zn (125  $\mu$ g/L),其中 Mn 和 K 促进子实体高产,K、Mg、Ca 有利于高产保持多代。抑制 I 型菌落菌丝徒长的最佳组合为 K (1.0 g/L)、Mg (0.05 g/L)、Ca (0.02 g/L)、Mn (20  $\mu$ g/L)、Zn (125  $\mu$ g/L),Mn 对其抑制作用最显著。

## 参考文献

- [1] 邵力平,沈瑞祥,张素轩,等. 真菌分类学. 北京:中国林业出版社,1984: 1-370.
- [2] 胡丰林,李增智. 虫草及相关真菌的次生代谢产物及其活性. 菌物学报,2007, **26**(4): 607-632.
- [3] 刘狄,何莉莉,王作乔,等. 继代培养对北虫草菌落形态及子实体产量的影响. 沈阳农业大学,2006, **37**(3): 538-541.
- [4] Cheng SW, Tariq M Butt. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiolog*, 2005, **151**(10): 3223-3236.
- [5] 梁宗琦, Roland TVF. 北虫草无性型的多型现象. 真菌学报,1998, **17**(1): 57-62.
- [6] 唐晓庆,樊美珍,李增智. 球孢白僵菌继代培养中菌落局变现象及环境影响因素的研究. 真菌学报,1996, **15**(3): 188-196.
- [7] Ryan MJ, Bridge PD, Sminth D, et al. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Applied Microbiology*, 2002(93): 163-168.
- [8] Kale SP, Cary JW, Baker C, et al. Genetic analysis of morphological variants of *Aspergillus parasiticus* deficient secondary metabolite production. *Mycol Res*, 2003, **107**(7): 831-840.
- [9] Ryena-Lopez GE, Ruiz-Herrera J. Specificity of DNA methylation changes during fungal dimorphism and relationship to polyamines. *Curr Microbiol*, 2004, **48**(2): 118-123.
- [10] Kim DH. Induced in DNA methylation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* due to successive transfer. *J Biochem Mol Biol*, 1997(30): 216-221.
- [11] Schaerffenberg. Biological and environmental condition for the development of mycoses caused by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Insect Pathol*, 1964(6): 8-12.
- [12] Fargues. Etude des condition d'infection des larves de *Doryphora*, *Leptinotarsa decem lineata* Say, Par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Entomophage*, 1972(17): 319-337.
- [13] 席敏. 不同培养基对平菇类食用菌试管子实体的抑制效果. 安徽农业科学,2002, **30**(3): 421-423.
- [14] 殷红. 无机硫和硫酸素对平菇生长发育的影响. 西北大学学报: 自然科学版,1995, **25**(1): 63-64.
- [15] 宫志远,于淑芳,曲玲. 营养和环境条件对杏鲍菇菌丝生长的影响. 食用菌学报,2002, **9**(3): 13-17.
- [16] 万鲁长,张柏松,黄春燕,等. 矿质元素对白灵侧耳和鲍鱼侧耳菌丝生长的影响. 山东科学,2006, **19**(2): 43-47.
- [17] Hammond SM, Kliger BN. Differential effects of monovalent and divalent ions upon the mode of action of the polyene antibiotic candicidin. *Journal of Applied Microbiology*, 1976(41): 59-68.
- [18] 高大文,文湘华,周小燕,等. 微量元素对白腐真菌的生长影响和抑制酵母菌效果的研究. 环境科学,2006, **27**(8): 1623-1626.
- [19] 何莉莉,韩成玲,李佩亮,等. 矿质元素对北虫草继代培养菌落类型的影响. 沈阳农业大学学报,2009, **40**(6): 672-677.