

一株野生蝉花的生物学特性及驯化栽培研究

刘 潮, 田雪莲, 唐仕香, 杨才静, 韩利红*

曲靖师范学院生物资源与食品工程学院/云南省高校特色果酒技术创新与应用工程研究中心, 云南曲靖 655011

摘 要: 蝉花是我国传统名贵药食两用真菌, 在绿色功能食品和新资源药品开发中具有重要应用价值。以云南曲靖一株野生蝉花为试验材料, 对其生物学特性和人工栽培条件进行研究, 为野生蝉花的驯化栽培提供理论基础。结合形态解剖学和分子系统发育学分析, 对野生蝉花进行准确物种鉴定; 利用单因素试验和正交试验, 对菌丝生物学特性和菌株驯化栽培条件开展研究。结果表明: 该蝉花分枝柄部橙黄色或黄白色, (8.0~28.0)mm×(1.5~3.0)mm, 分生孢子长椭圆形, (4.0~8.5)μm×(1.5~3.5)μm; 菌株菌丝生长的最适温度为 24 ℃、pH 为 6、碳源为蔗糖、氮源为酵母粉、无机盐为硫酸镁; 在最适 pH 和最适温度下, 碳源对菌丝生长影响最大, 极差为 1.21, 其次为氮源和无机盐, 极差分别为 0.39 和 0.13; 蝉花菌丝生长的最适因子组合为: 蔗糖 20 g/L、酵母粉 2 g/L、硫酸镁 2 g/L。蝉花人工栽培使用小麦和大米以 1:1 混合的培养基, 子实体采收周期约为 40~45 d, 每个栽培瓶蝉花干重平均约 9.56 g。人工栽培收获蝉花子实体与野生子实体在外部形态特征上明显不同, 子实体呈淡土黄色至淡黄色, 分枝较少, 高 1.5~5.0 cm, 宽 0.3~0.8 cm, 厚 0.1~0.2 cm; 孢梗束外密布污白色絮状或粉末状分生孢子。蝉花优良菌株和最优培养条件的筛选, 将为其物种多样性保护、种质资源收集和开发利用提供科学依据。

关键词: 蝉花; 生物学性状; 驯化; 筛选

中图分类号: S646 文献标志码: A

Biological Characteristics and Domestication of a Wild *Cordyceps chanhua*

LIU Chao, TIAN Xuelian, TANG Shixiang, YANG Caijing, HAN Lihong*

College of Biological Resource and Food Engineering, Qujing Normal University / Yunnan Engineering Research Center of Fruit Wine, Qujing, Yunnan 655011, China

Abstract: *Cordyceps chanhua* is an important Chinese traditional medicine and food, that has important application value in the development of green functional food and new resource drugs. Taking one wild fungi Chanhua collected from Qujing of Yunnan province as the experimental material, the biological characteristics and artificial cultivation conditions were studied for the purpose of domestication and cultivation. Based on the morphological anatomy and molecular phylogenetic analysis, a wild ascomycetes was identified as *C. chanhua*. The biological characteristics and domestication of *C. chanhua* strain were studied by single factor experiments and orthogonal tests. The result showed that the branch stalk of *C. chanhua* was orange yellow or yellow white, (8.0–28.0)mm×(1.5–3.0)mm, and the conidia was oblong, (4.0–8.5)μm×(1.5–3.5)μm. The optimum temperature for the mycelial growth was 24 ℃, the optimum pH value was 6, the carbon source, nitrogen source and mineral salt was sucrose, yeast powder and magnesium sulfate respectively. The results of orthogonal test based on three factors under the optimum pH value and temperature showed that carbon source had the greatest impact on the mycelial growth, followed by nitrogen source and mineral salt, with range 1.21, 0.39 and 0.13 respectively. Therefore, the optimal combination of factors for the mycelial growth of *C. chanhua* was sucrose 20 g/L, yeast powder 2 g/L and magnesium sulfate 2 g/L. The artificial cultivation of *C. chanhua* utilized

收稿日期 2022-10-31; 修回日期 2022-11-29

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32100010, No. 31860005); 云南省地方本科高校基础研究联合专项 (No. 202001BA070001-002)。

作者简介 刘 潮 (1980—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 植物多样性及系统发育。*通信作者 (Corresponding author): 韩利红 (HAN Lihong), E-mail: hanlihong9527@126.com。

the 1 : 1 mixed medium of wheat and rice, and the harvest cycle of fruiting body was about 40–45 days, and the average dry weight of each cultivated *Chanhua* was about 9.56 g. The external morphological characteristics of artificially harvested *C. chanhua* were significantly different from those of wild fruiting body. The fruiting body was yellowish to light yellow, with few branches, 1.5–5.0 cm in length, 0.3–0.8 cm in width and 0.1–0.2 cm in depth. The sporangium bundles were covered with dirty white flocculent or powdery conidia. The screening of excellent strains and optimal culture conditions of *C. chanhua* would provide a theoretical basis for its study on the diversity of germplasm resources, protection and utilization.

Keywords: *Cordyceps chanhua*; biological characteristics; domestication; screen

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.05.012

蝉花 (*Cordyceps chanhua*) 又名虫花、知了花、蝉草或金蝉花, 是我国名贵的药食虫草真菌, 具有重要经济价值^[1-2]。隋唐《药性论》和明代《本草纲目》详细记载了蝉花的主要功效。国家卫生健康委发布的 2020 年第 9 号公告, 首次将人工培养的蝉花子实体列为新食品原料, 这是继广东虫草和蛹虫草之后的又一个被正式审批的虫草类新食品原料, 极大促进了蝉花产业的发展。蝉花富含多种营养物质和化学活性成分, 如蛋白质、不饱和脂肪酸、腺苷、多糖、甘露醇和矿物质等; 野生蝉花与人工培养子实体的多种药理功效相似, 且不同培养时期和不同部位的蝉花代谢产物显著不同, 有望开发成绿色功能食品和治疗肿瘤的新资源药物^[3-6]。目前, 约 20 种虫草属物种在市场上广泛流通^[7-9]。

前人曾将 *Isaria cicadae* 视作蝉花的学名, 将 *C. cicadae* 作为 *I. cicadae* 的有性型^[10]。分子生物学证据表明, 虫草属 (*Cordyceps*) 和棒束孢属 (*Isaria*) 均为多系起源, 此二属的分类地位和属下物种多样性也发生了较大变化^[11-13]。李增智等^[14]通过形态分类学和分子系统学研究, 将采自江西井冈山山的有性型虫草标本描述为虫草科虫草属的 1 个新种——蝉花 (*Cordyceps chanhua* Z. Z. Li, F. G. Luan, Hywel-Jones, C. R. Li & S. L. Zhang), 首次明确了蝉花的分类地位, 同时明确指出“蝉花”可能是一个复合群, 从而为蝉花的开发利用和虫草物种多样性研究提供理论基础^[6]。野生蝉花子座橙色至淡橘黄色, 具多次分枝; 子囊壳埋生, 子囊孢子丝状, 光滑透明, (247~360) $\mu\text{m} \times (1.5 \sim 1.8) \mu\text{m}$; 孢梗束淡黄色至淡黄褐色, 分生孢子长椭圆形, (6.4~13.8) $\times (2.1 \sim 3.1) \mu\text{m}$ ^[10]。虽然野生蝉花和人工栽培蝉花在形态上具有一定差异, 但二者的主要营养成分、活性物质和药效等相似^[4, 8]。

蝉花具有巨大开发价值, 但野生蝉花资源短

缺, 影响野生蝉花菌丝生长和子实体形成的重要因素目前还没有系统的研究, 中国西南地区的蝉花资源有待深入挖掘^[15-16]。本研究基于形态解剖学和分子生物学证据, 对采自云南曲靖的一株野生虫草进行物种鉴定, 通过组织分离和菌株纯化, 对其生物学特性和栽培驯化条件进行初步研究, 以期对虫草属物种多样性研究、种质资源保护和开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为一株野生虫草 (采集号: hlh1945), 采自云南曲靖翠峰山 (24°59'N, 103°96'E, 海拔约 2000 m)。基因组 DNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; 分子生物学实验试剂购自北京百迈客生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离与物种鉴定 (1) 菌株分离。利用组织分离法, 从野外采集的新鲜虫体中挑取少量菌丝在基础培养基上获得菌株, 菌株保存于曲靖师范学院云南高原生物资源保护与利用研究中心。虫体利用硅胶干燥, 制作成分子材料, 用于 DNA 提取和标本观察。

(2) 培养基制备。基础培养基: 葡萄糖 20 g、蛋白胨 2 g、琼脂 20 g、磷酸二氢钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、维生素 B1 10 mg, 定容至 1000 mL, 自然 pH。液体培养基: 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, 磷酸二氢钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、维生素 B1 10 mg, 定容至 1000 mL, 自然 pH。培养基于高温蒸汽灭菌锅内 121 °C 灭菌 20 min。

(3) 标本和菌株形态观察。观察野生虫草子实体的形状、大小和颜色等特征, 根据子实体和菌丝体的菌丝、产孢组织和孢子等显微特征, 进行形态学初步鉴定。

1.2.2 分子系统发育分析 分别提取野外采集的子实体、分离菌株和人工栽培获得的子实体的总 DNA。基于通用引物 ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGACGAAGTAA-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 分别扩增以上 3 种材料的 ITS 片段。扩增步骤：95 ℃ 预变性 3 min；95 ℃ 变性 30 s, 50 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 35 个循环, 72 ℃ 继续延伸 7 min, 将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。使用 RAxML v.7.2.6 软件, 基于最大似然法构建系统发育树, 步长值设置为 1000。

1.2.3 菌丝体生物学特性研究 在基础培养基中接种菌株, 使菌株活化, 为菌丝体生物学特性研究提供材料。

(1) 碳源对菌丝生长的影响。以不加葡萄糖的基础培养基为空白对照, 将碳源分别设定为蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、果糖、葡萄糖和甘油, 浓度均为 20 g/L, pH 为 6。将直径约 5 mm 菌丝块接种至直径为 6 cm 的平板上, 24 ℃ 避光培养 10 d, 每个处理设置 3 个重复。菌丝萌发后, 每天观察、测量并记录菌丝生长情况, 从第 2 天起采用十字交叉法测量菌丝生长速度, 并观察记录菌落形态。

(2) 氮源对菌丝生长的影响。以不加蛋白胨的基础培养基为空白对照, 将氮源分别设定为酵母粉、蛋白胨、硝酸钾、氯化铵、硫酸铵和尿素, 浓度均为 2 g/L, pH 为 6。

(3) 无机盐对菌丝生长的影响。以不加磷酸二氢钾和硫酸镁的基础培养基为空白对照, 将无机盐分别设定为硫酸镁、磷酸二氢钾、硫酸钙、硫酸铁、硫酸锌和硫酸铜, 浓度均为 2 g/L, pH 为 6。

(4) 不同 pH 对菌丝生长的影响。将基础培养基设置 7 个 pH 梯度 (4、5、6、7、8、9、10), 进行菌丝培养。

(5) 不同温度对菌丝生长的影响。将培养温度设置 7 个梯度 (15、18、21、24、27、30、33 ℃), 进行菌丝培养。

1.2.4 菌丝生长培养基优化的正交试验 在上述单因素试验基础上, 对影响蝉花菌丝生长的培养基条件进行正交试验 (表 1)。利用三因素三水平基于最适 pH 和温度, 以碳源、氮源和无机盐为影响因子进行正交试验, 每个处理设定 6 个重复, 确定并优化蝉花菌丝生长的最佳培养基。

表 1 蝉花菌丝生长正交试验三因素水平表
Tab. 1 Orthogonal test (three factors) of mycelial growth of *C. chanhua*

水平 Level	因素 Factor		
	碳源 Carbon source (A)	氮源 Nitrogen source (B)	无机盐 Mineral salt (C)
1	蔗糖	酵母粉	硫酸镁
2	麦芽糖	蛋白胨	磷酸二氢钾
3	CK1	硝酸钾	硫酸钙

1.2.5 人工栽培试验 液体菌种制备：将直径约 5 mm 的菌块接种至装有 100 mL 液体优化培养基的三角瓶中, 150 r/min、24 ℃ 避光振荡培养 6 d, 备用。在高 9.0 cm、宽 6.5 cm 的组培瓶中装入 40 g 小麦和小米以 1 : 1 混合的培养基, 水 60 mL, 透气膜封口, 121 ℃ 灭菌 20 min, 反复灭菌 3 次, 冷却后接种 5 mL 稀释 5 倍的液体菌种, 重复 10 瓶, 置于 24 ℃ 培养箱光照培养后采收子实体。

1.3 数据处理

使用 SPSS 19.0 软件进行试验数据统计分析, 在单因素和正交试验方差分析中, $P < 0.05$ 代表差异显著。

2 结果与分析

2.1 物种鉴定

通过观察野外采集的新鲜虫草标本, 获得相关外部形态特征和内部显微结构。从蝉若虫头部和胸部各长出若干个淡黄色至橙色具多分枝的子座和孢梗束, 分枝柄部橙黄色或黄白色, (8.0~28.0)mm×(1.5~3.0)mm; 末端淡黄白色, 形成多个西蓝花状或鸡冠状产孢结构, 布满污白色粉末状分生孢子; 分生孢子长椭圆形, 连接成长链状, (4.0~8.5)μm×(1.5~3.5)μm (图 1)。基于以上形态特征, 将其初步鉴定为蝉花 (*C. chanhua*)。

野外采集的蝉花子实体、分离菌株和人工栽培获得的子实体与蝉花模式标本 (JGS150713) 的 ITS 片段在系统发育树中聚成一个独立的分化支系, 并获得 100% 支持率, 结果表明此支系样本代表蝉花 (*C. chanhua*) (图 2)。

2.2 单因素试验

蝉花菌丝在不同碳源培养基中均能生长, 但生长速度和菌丝活力存在一定差异 (表 2, 图 3)。菌丝在蔗糖培养基上生长最快, 长势最好, 菌丝洁白且呈绒毛状; 其次是麦芽糖和无碳源对照组 (CK1) 培养基; 在甘油培养基上生长最慢, 长势最差。CK1 菌丝虽能生长, 但菌丝生长速度不

表 2 不同单因素因子对蝉花菌丝生长的影响
Tab. 2 Effect of different single factor on mycelial growth of *C. chanhua*

培养条件 Condition of culture	因素 Factor	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (mm·d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth vigor
碳源	蔗糖	3.03±0.08 ^a	+++
	麦芽糖	2.57±0.08 ^b	++
	CK1	2.45±0.01 ^b	++
	可溶性淀粉	2.12±0.08 ^c	++
	果糖	1.93±0.03 ^c	++
	葡萄糖	1.93±0.03 ^c	++
	甘油	1.00±0.05 ^d	++
氮源	酵母粉	3.04±0.05 ^a	+++
	蛋白胨	2.58±0.03 ^b	+++
	硝酸钾	2.57±0.08 ^b	+++
	CK2	1.78±0.03 ^c	++
	氯化铵	1.77±0.03 ^c	++
	硫酸铵	1.52±0.03 ^d	++
	尿素	0.82±0.03 ^e	+
无机盐	硫酸镁	2.67±0.03 ^a	++
	磷酸二氢钾	2.65±0.05 ^a	++
	硫酸钙	2.63±0.06 ^a	++
	CK3	2.12±0.03 ^b	++
	硫酸铁	2.10±0.03 ^b	++
	硫酸锌	2.12±0.03 ^b	++
	硫酸铜	2.12±0.03 ^b	++
pH	10	0.58±0.08 ^f	+
	9	1.10±0.09 ^d	++
	8	2.15±0.13 ^c	++
	7	2.82±0.03 ^b	+++
	6	3.10±0.05 ^a	+++
	5	2.83±0.05 ^b	+++
	4	0.85±0.05 ^e	++
温度	33 ℃	0.17±0.10 ^e	+
	30 ℃	0.42±0.10 ^d	+
	27 ℃	1.67±0.03 ^c	+
	24 ℃	2.80±0.09 ^a	+++
	21 ℃	2.38±0.03 ^b	++
	18 ℃	2.37±0.06 ^b	++
	15 ℃	1.20±0.05 ^c	++

注：+++表示菌丝生长速度快、长势旺盛，++表示菌丝生长速度较快、长势一般，+表示菌丝生长速度缓慢或不生长、长势较弱。不同小写字母代表差异显著（*P*<0.05）。CK1、CK2、CK3 分别代表不加碳源、氮源和无机盐的基础培养基。

Note: +++ represents fast and vigorous growth of mycelium, ++ represents moderate growth of mycelium, + represents weak growth or no growth of mycelium. Different lowercase letters represent significant difference (*P*<0.05). CK1、CK2 and CK3 represent the basic culture medium without carbon source, nitrogen source and mineral salt respectively.

在酵母粉培养基中生长最快，长势最好，菌丝洁白呈毛絮状，其次为蛋白胨、硝酸钾、CK2、氯化铵和硫酸铵；以尿素为氮源时，菌丝生长速度最慢且长势最差。以氯化铵和硫酸铵为氮源的菌丝最浓密。和碳源类似，菌丝对氮源的种类也具有广泛适应性。综合菌丝生长速度和长势，可确定最佳氮源为酵母粉（表 2，图 3）。

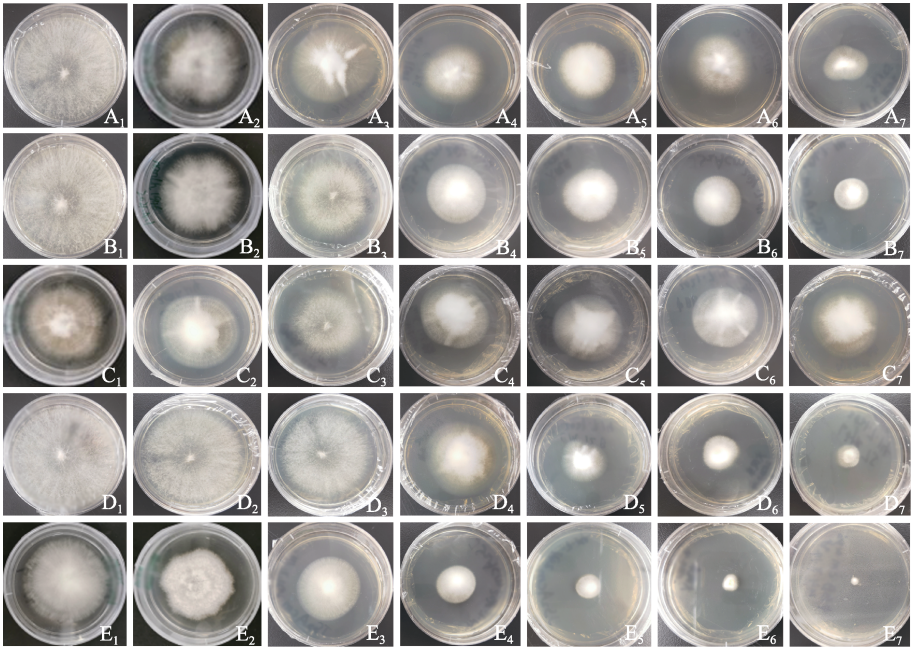
不同无机盐对菌丝生长影响较小，菌丝在以硫酸镁、磷酸二氢钾、硫酸钙为无机盐的培养基上生长速度较快，且差异不显著；在硫酸铁、硫酸锌和硫酸铜培养基上生长较慢，且差异不显著；但前、后 2 组无机盐下的菌丝生长速度差异显著。综合菌丝生长速度和长势，确定最适无机盐为硫酸镁（表 2，图 3）。

不同 pH 对菌丝生长影响显著，当 5<pH<8 时，显著促进菌丝生长，结果表明菌丝对酸碱环境适应良好。pH 高于 6 和低于 6 时，随着 pH 的增高和降低，菌丝生长速度均呈逐渐减弱趋势。pH 为 6 时菌丝生长速度最快、长势最好，菌丝洁白呈毛絮状，将其确定为最适 pH（表 2，图 3）。

菌丝生长的温度适应范围较广，15~33 ℃均能生长，但不同温度条件下的菌丝生长速度存在显著差异。在设定的 6 个温度梯度中，温度低于 24 ℃时，菌丝生长速度随温度增高而逐渐加快，菌丝较为稠密；温度高于 24 ℃时，菌丝生长逐渐受抑制，生长速度变慢；温度达到 33 ℃时，菌丝不再生长。24 ℃条件下，菌丝长势良好、生长快，呈毛毡状，将其确定为最适温度（表 2，图 3）。

2.3 菌丝生长正交试验

单因素试验表明，菌丝生长的最适 pH 为 6，最适温度为 24 ℃，在此条件下，对 3 个因素碳源、氮源和无机盐各设置 3 个成分水平，进行三因素三水平 L₉(3⁴)正交试验（表 3，图 4）。碳源的极差最大，*R* 为 1.21，说明碳源是影响蝉花菌丝生长的重要因素，其次为氮源和无机盐。从均值 *T* 可知，菌丝生长培养基最佳碳源、氮源和无机盐分别为蔗糖、酵母粉和硫酸镁。方差分析表明，碳源的 *F* 值最大，3 种因素的显著性差异依次为碳源>氮源>无机盐，这与正交试验结果的直观分析一致（表 3，表 4）。在蔗糖-酵母粉-硫酸镁组合下，蝉花菌丝生长速度快、长势旺盛、不易老化（图 4）。



A₁: 蔗糖; A₂: 麦芽糖; A₃: CK1; A₄: 可溶性淀粉; A₅: 果糖; A₆: 葡萄糖; A₇: 甘油; B₁: 酵母粉; B₂: 蛋白胨; B₃: 硝酸钾; B₄: CK2; B₅: 氯化铵; B₆: 硫酸铵; B₇: 尿素; C₁: 硫酸镁; C₂: 磷酸二氢钾; C₃: 硫酸钙; C₄: CK3; C₅: 硫酸铁; C₆: 硫酸锌; C₇: 硫酸铜; D₁~D₇: pH 为 6, 5, 7, 8, 9, 4, 10; E₁~E₇: 24 ℃, 21 ℃, 18 ℃, 15 ℃, 27 ℃, 30 ℃, 33 ℃。
A₁: Sucrose; A₂: Maltose; A₃: CK1; A₄: Soluble starch; A₅: Fructose; A₆: Glucose; A₇: Glycerin; B₁: Yeast powder; B₂: Peptone; B₃: Ammonium nitrate; B₄: CK2; B₅: Ammonium chloride; B₆: Ammonium sulfate; B₇: Urea; C₁: Magnesium sulfate; C₂: Monobasic potassium phosphate; C₃: Calcium sulfate; C₄: CK3; C₅: Ferric sulfate; C₆: Zinc sulphate; C₇: Copper sulfate; D₁~D₇: pH 6, 5, 7, 8, 9, 4, 10; E₁~E₇: 24 ℃, 21 ℃, 18 ℃, 15 ℃, 27 ℃, 30 ℃, 33 ℃.

图 3 不同单因素因子对菌丝生长的影响

Fig. 3 Effect of different single factor on mycelial growth of *C. chanhua*

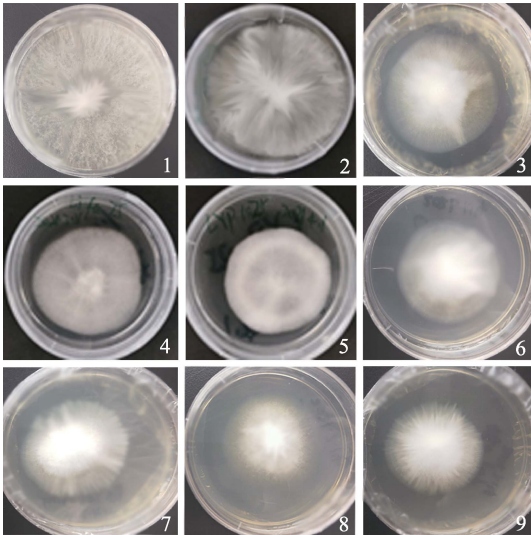
表 3 蝉花菌丝生长正交试验结果的直观分析

Tab. 3 Direct-viewing analysis of orthogonal test of mycelial growth of *C. chanhua*

编号 No.	因素 Factor				菌丝生长速度 Mycelial growth rate/(mm·d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth vigor
	碳源 Carbon source (A)	氮源 Nitrogen source (B)	无机盐 Mineral salt (C)	CK (D)		
1	1	1	1	1	3.08±0.04	+++
2	1	2	2	2	2.83±0.03	+++
3	1	3	3	3	2.50±0.03	++
4	2	1	2	3	1.98±0.03	++
5	2	2	3	1	1.92±0.03	++
6	2	3	1	2	1.73±0.02	++
7	3	1	3	2	1.72±0.02	++
8	3	2	1	3	1.72±0.02	++
9	3	3	2	1	1.37±0.01	++
T ₁	25.25	20.35	19.60	19.10		
T ₂	16.90	19.40	18.55	18.85		
T ₃	14.40	16.80	18.40	18.60		
X ₁	2.81	2.26	2.18	2.12		
X ₂	1.88	2.16	2.06	2.09		
X ₃	1.60	1.87	2.05	2.07		
R	1.21	0.39	0.13	0.05		

注: 菌丝生长速度为 6 次重复的平均值; T_n 表示 n 水平上的菌丝生长速度加和值; X_n 表示 n 水平上的菌丝平均生长速度; R 为极差; +++ 表示菌丝生长速度快、长势旺盛, ++ 表示菌丝生长速度较快、长势一般。

Note: Mycelium growth rate is the average value of six replicates; T_n represents the sum of mycelial growth rates at the n level; X_n represents the average mycelial growth rate at the n level; R is the range; +++ represents fast and vigorous growth of mycelium, ++ represents moderate growth of mycelium.



1~9: 正交试验的编号 (同表 3)。

1~9: Test number of orthogonal test (same as Table 3).

图 4 蝉花菌丝生长的正交试验

Fig. 4 Orthogonal test of mycelial growth of *C. chanhua*

2.4 人工栽培

蝉花在小麦和大米以 1 : 1 混合的培养基上可正常生长, 子实体采收周期约为 40~45 d, 每个栽培瓶收获蝉花干重平均约 9.56 g。人工栽培收获蝉花子实体与野生子实体在外部形态特征上明

表 4 蝉花菌丝生长正交试验结果的方差分析
Tab. 4 F-test of orthogonal test of mycelial growth of *C. chanhua*

变异来源 Variation source	III类平方和 Sum of type III squares	自由度 df	均方 Mean square	<i>F</i>	显著性 Significance
修正模型	2.654	6	0.442	183.429	0.005
碳源	2.373	2	1.187	492.184	0.002
氮源	0.249	2	0.125	51.737	0.019
无机盐	0.031	2	0.015	6.364	0.136
误差	0.005	2	0.002		
总计	42.139	9			

注： $R^2=0.998$ （调整 $R^2=0.993$ ）。
Note: $R^2=0.998$ (Adjusted $R^2=0.993$).

显不同，子实体呈淡土黄色至淡黄色，较柔韧，扁平弯曲状、分枝较少，高 1.5~5.0 cm，宽 0.3~0.8 cm，厚 0.1~0.2 cm；孢梗束外密布污白色絮状或粉末状分生孢子；但二者显微结构类似，分生孢子呈长椭圆形，连接成长链状， $(3.5\sim8.5)\times(1.5\sim3.0)\mu\text{m}$ （图 1，图 5）。

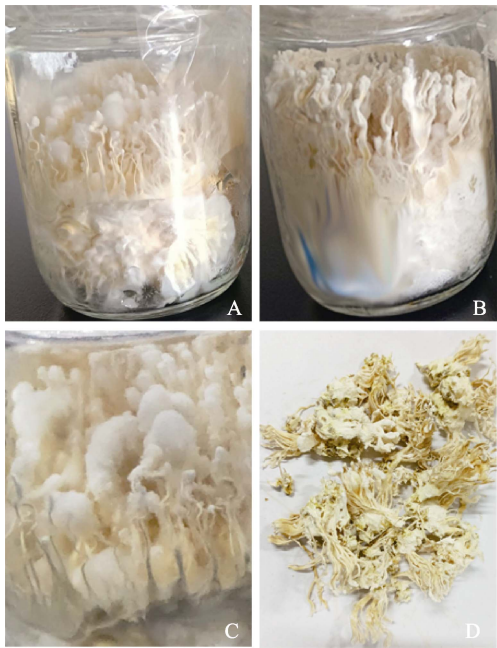


图 5 人工栽培蝉花的子实体形态

Fig. 5 Morphology of cultivated fruit body of *C. chanhua*

3 讨论

野生菌种质资源收集和遗传多样性研究是我国食用菌产业发展的重要基础性工作，野生食药菌株的分离、鉴定和驯化不仅为真菌资源开发

和利用提供了原材料，还有利于保护真菌物种多样性^[17-18]。云南地形地貌复杂，兼具热带、亚热带和温带植被类型，孕育了极其丰富的真菌资源，但还有大量野生食用菌物种深藏于山间林下而鲜为人知，亟需加大研发力度，充分发挥和持续利用云南丰富的野生食用菌资源，为地方经济建设和社会发展服务^[19]。蝉花是我国传统名贵药食两用真菌，已有 1500 多年的利用历史。蝉花基因组约为 36.9 Mb，基因编码蛋白数量高于其他虫草真菌，线粒体基因组长度也呈现出多态性，表明其具有丰富的遗传基因^[20-21]。蝉花不同种群内个体在形态特征、生理特性和分子序列等方面具有丰富的遗传变异性^[22-23]。其不同种群的遗传谱系随机分布，与地理来源无明显相关性，而形态性状具有一定地理相关性^[23-25]，温度和湿度是影响蝉花分布的主要因素^[26]。

本研究从滇东海拔约 2000 m 的云南松林下获得一株野生虫草，该物种野生子实体、实验室培养菌丝及人工栽培子实体的外部形态结构和内部显微结构与模式标本相似，其 ITS 片段与蝉花模式标本以高支持率聚在一个系统发育支，利用形态解剖和分子系统发育分析，将其准确鉴定为蝉花。由于天然野生蝉花资源极度缺乏，不少研究逐渐关注蝉花菌丝体的液体发酵，其培养周期短、发酵条件可控、易规模化生产，因此成为获取蝉花原材料的主要渠道。本文研究表明，蝉花菌丝最适生长温度为 24 ℃，最适 pH 为 6，最适碳源、氮源和无机盐分别为蔗糖、酵母粉和硫酸镁，碳源对菌丝生长影响最大，其次为氮源，无机盐对菌丝生长影响较小。前人研究表明，碳源、氮源和无机盐对菌丝生长均有显著影响，培养温度范围为 25~28 ℃，最适 pH 范围为 6~7^[27-29]，与本文研究基本一致，表明蝉花不同菌株的培养条件较为稳定。

蝉花具有重要的开发利用价值，因此针对蝉花的人工栽培开展了大量研究。谭悠久等^[2]通过蝉花野外菌株繁育，初步建立了蝉花菌株的子实体筛选和分子鉴定体系，有效提高了子实体产量。本研究以小麦和大米为培养基，在 24 ℃下培养 40~45 d 后，可获得长势整齐的子实体，人工培养获得的子实体形态与野生蝉花具有一定差异，颜色较浅、分枝较少、子座和孢梗束呈扁平状，分生孢子粉呈污白色，分生孢子形状和大小与野生

蝉花一致。陈祝安等^[30]首次通过固体培养,初步实现蝉花的人工栽培,观察到类似寄主体上的孢梗束;孢梗束生长和孢子产量对碳源浓度较敏感,而氮源对其影响不大。蝉花在以无机盐为主要营养成分的培养基上均能产生孢梗束,以大米为营养物质的蝉花孢梗束生长最快,适合进行规模化培养,添加蝉蛹粉可显著提高子实体产量,蝉花氨基酸、粗多糖和蛋白质含量均高于野生蝉花相应物质含量^[31-32]。有研究推测特定微生物群落和土壤理化性质可能在蝉花的子实体发生中起着关键作用^[33]。

今后,拟通过进一步的实验室培养和野外繁育,优化菌丝培养基配方的最适浓度,筛选人工栽培技术参数,并从分子生物学角度对菌株进行优化^[34],以期改善蝉花子实体品质,提升其活性物质含量,获得稳定高产的优质菌株资源,为蝉花的综合开发利用提供理论、资源和技术支持。

参考文献

- [1] 李增智, HYWEL-JONES N L, 栾丰刚, 张胜利, 孙长胜, 陈祝安, 李春如, 谭悠久, 董建飞. 与蝉花有关的虫草菌生物多样性的研究 I: 文献考证[J]. 菌物学报, 2020, 39(12): 2191-2201.
LI Z Z, HYWEL-JONES N L, LUAN F G, ZHANG S L, SUN C S, CHEN Z A, LI C R, TAN Y J, DONG J F. Biodiversity of cordycipitoid fungi associated with *Isaria cicadae* I: literature study[J]. Mycosystema, 2020, 39(12): 2191-2201. (in Chinese)
- [2] 谭悠久, 龙文君, 朱冰舟, 董建飞, 唐瑶, 李春如, 江可, 孙长胜. 野外繁育蝉花菌株的筛选及分子标记分析[J]. 西南农业学报, 2021, 34(9): 1835-1839.
TAN Y J, LONG W J, ZHU B Z, DONG J F, TANG Y, LI C R, JIANG K, SUN C S. Screening and molecular marker analysis of field breeding *Isaria cicadae* strains[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(9): 1835-1839. (in Chinese)
- [3] LEE L Y, HSU J H, FU H I, CHEN C C, TUNG K C. Lowering the intraocular pressure in rats and rabbits by *Cordyceps cicadae* extract and its active compounds[J]. Molecules, 2022, 27(3): 707.
- [4] KIHOT, NAGAI K, MIYAMOTO I, WATANABE T, UKAI S. Polysaccharides in fungi. XXV. Biological activities of two galactomannans from the insect-body portion of Chan hua (fungus: *Cordyceps cicadae*)[J]. Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 1990, 110(4): 286-288.
- [5] FENHUI S, HE L, QIAN J, ZHANG Z, ZHENG H. Optimization of the nutritional constituents for ergosterol peroxide production by *Paecilomyces cicadae* based on the uniform design and mathematical model[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 1-10.
- [6] NXUMALO W, ELATEEQ A A, SUN Y. Can *Cordyceps cicadae* be used as an alternative to *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis*? -a review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 257: 112879.
- [7] HE Y, ZHANG W, PENG F, LU R, ZHOU H, BAO G, WANG B, HUANG B, LI Z, HU F. Metabolomic variation in wild and cultured cordyceps and mycelia of *Isaria cicadae*[J]. Biomedical Chromatography, 2019, 33(4): e4478.
- [8] ZHA L S, HUANG S K, XIAO Y P, BONMEE S, EUNGWANICHAYAPANT P D, MCKENZIE E H C, KRYUKOV V, WU X L, HYDE K D, WEN T C. An evaluation of common *Cordyceps* (Ascomycetes) species found in Chinese markets[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2018, 20(12): 1149-1162.
- [9] MASSEE G. A revision of the genus *Cordyceps*[J]. Annals of Botany, 1895, 9(33): 1-44.
- [10] ZHA L S, XIAO Y P, JEEWON R, ZOU X, WANG X, BOONMEE S, EUNGWANICHAYAPANT P D, MCKENZIE E H C, HYDE K D, WEN T C. Notes on the medicinal mushroom chanhua [*Cordyceps cicadae* (Miq.) Massee][J]. Chiang Mai Journal of Science, 2019, 46: 1023-1035.
- [11] SUNG G H, HYWEL JONES N L, SUNG J M, LUANGSA-ARD J, SHRESTHA B, SPATAFORA J W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi[J]. Studies in Mycology, 2007, 57: 5-59.
- [12] KEPLER R M, LUANGSA-ARD J J, HYWEL-JONES N L, QUANDT C A, SUNG G H, REHNER S A, AIME M C, HENKEL T W, SANJUAN T, ZARE R, CHEN M, LI Z, ROSSMAN A Y, SPATAFORA J W, SHRESTHA B. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales)[J]. IMA Fungus, 2017, 8(2): 335-353.
- [13] 林俨, 刘玉军, 汪婷, 陈名君. 几株类棒束孢菌株分类地位的修订[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4555-4563.
LIN Y, LIU Y J, WANG T, CHEN M J. Revision of taxonomic status of several isaria-like strains[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4555-4563. (in Chinese)
- [14] 李增智, 栾丰刚, HYWEL-JONES N L, 张胜利, 陈名君, 黄勃, 孙长胜, 陈祝安, 李春如, 谭悠久, 董建飞. 与蝉花有关的虫草菌生物多样性的研究 II: 重要药用真菌蝉花有性型的发现及命名[J]. 菌物学报, 2021, 40(1): 95-107.
LI Z Z, LUAN F G, HYWEL JONES N L, ZHANG S L, CHEN M J, HUANG B, SUN C S, CHEN Z A, LI C R,

- TAN Y J, DONG J F. Biodiversity of cordycipitoid fungi associated with *Isaria cicadae* Miquel II: teleomorph discovery and nomenclature of Chanhua, an important medicinal fungus in China[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(1): 95-107. (in Chinese)
- [15] LI C, XU S. Edible mushroom industry in China: current state and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106: 3949-3955.
- [16] LI C, TAN Q, BIAN Y, XIE B, LIU Z, LI Y. The status and prospection of edible mushroom industry in China[J]. *Journal of Fungal Research*, 2019, 17(1): 1-10.
- [17] 张焱珍, 周会明, 白玉英, 柴红梅, 古广红, 赵娅通, 田利波, 卯明娟. 一株临沧野生灵芝的鉴定与驯化栽培[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(11): 2176-2182.
- ZHANG Y Z, ZHOU H M, BAI Y Y, CHAI H M, GU G H, ZHAO Y T, TIAN L B, MAO M J. Identification and domestication cultivation of a wild-type *Ganoderma lingzhi* strain from Lincang, Yunnan[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(11): 2176-2182. (in Chinese)
- [18] 韩利红, 付小林, 王远献, 陶雾, 高忠明, 刘潮. 药用真菌蛹虫草优良菌株筛选及资源特性研究[J]. *热带作物学报*, 2022, 43(8): 1604-1612.
- HAN L H, FU X L, WANG Y X, TAO W, GAO Z M, LIU C. Screening of excellent strains and resource characteristics of the medicinal fungus *Cordyceps militaris*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2022, 43(8): 1604-1612. (in Chinese)
- [19] 杨祝良, 王向华, 吴刚. 云南野生菌[M]. 北京: 科学出版社, 2022: 2-5.
- YANG Z L, WANG X H, WU G. *Mushrooms of Yunnan*[M]. Beijing: Science Press, 2022: 2-5. (in Chinese)
- [20] 冯德龙, 胡惠萍, 黄龙花, 谢意珍, 吴清平, 霍光华. 野生虫草无性型分离株分子鉴定及遗传多样性的研究[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(4): 108-113, 167.
- FENG D L, HU H P, HUANG L H, XIE Y Z, WU Q P, HUO G H. Molecular identification of wild *Cordyceps asexual* isolates and investigation of their genetic diversity[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2017, 33(4): 108-113, 167. (in Chinese)
- [21] FAN W W, ZHANG S, ZHANG Y J. The complete mitochondrial genome of the Chan - hua fungus *Isaria cicadae*: a tale of intron evolution in Cordycipitaceae[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(2): 864-879.
- [22] 胡海燕. 蝉棒束孢(蝉拟青霉)的遗传多样性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2009.
- HU H Y. Genetic diversity of *Corynespora cicada* (*Paecilomyces cicada*)[D]. Guiyang: Guizhou University, 2009. (in Chinese)
- [23] 李建平, 张铁, 曾文波. 蝉花居群形态变异式样[J]. *中国食用菌*, 2018, 37(3): 64-69.
- LI J P, ZHANG T, ZENG W B. Morphological variation pattern of *Isaria cicadae* population[J]. *Edible Fungi of China*, 2018, 37(3): 64-69. (in Chinese)
- [24] 曾文波, 常衬心, 李建平, 王元兵, 代永东, 虞泓. 蝉棒束孢显微形态变异式样[J]. *微生物学报*, 2017, 57(3): 350-362.
- ZENG W B, CHANG C X, LI J P, WANG Y B, DAI Y D, YU H. Micro-morphological variation pattern of *Isaria cicadae*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(3): 350-362. (in Chinese)
- [25] 张胜利, 于士军, 栾丰刚, 蒲顺昌, 陈雪, 李增智. 引致蝉若虫地方病的蝉棒束孢种群遗传结构[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(5): 1679-1686.
- ZHANG S L, YU S J, LUAN F G, PU S C, CHEN X, LI Z Z. Population genetic structure of *Isaria cicadae* causing enzootic of cicadas nymphs[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(5): 1679-1686. (in Chinese)
- [26] 孙大坤. 中国蝉棒束孢居群谱系地理及适生区分布研究[D]. 昆明: 云南大学, 2017.
- SUN D K. Study on phylogeography and suitable distribution of *Isaria cicadae* populations in China[D]. Kunming: Yunnan University, 2017. (in Chinese)
- [27] 李忠, 刘爱英, 金道超. 蝉拟青霉深层发酵的研究[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(6): 682-687.
- LI Z, LIU A Y, JIN D C. Study on submerged fermentation of *Paecilomyces cicadae*[J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2010, 30(6): 682-687. (in Chinese)
- [28] 文欣. 蝉花真菌的筛选及其液态发酵工艺的优化[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- WEN X. Screening of *Isaria cicadae* and optimization of liquid fermentation process[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [29] 陈显群, 羊悦, 杨胜利. 蝉花液体发酵产胞外多糖培养基优化研究[J]. *食用菌*, 2015, 37(1): 10-13.
- CHEN X Q, YANG Y, YANG S L. Optimization of extracellular polysaccharide production medium by liquid fermentation of *Isaria cicadae*[J]. *Edible Fungi*, 2015, 37(1): 10-13. (in Chinese)
- [30] 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]. *菌物学报*, 1993, 12(2): 138-144.
- CHEN Z A, LIU G Y, HU S Y. Studies on cultivation of *Paecilomyces cicadae* and its pharmacological function[J]. *Mycosystema*, 1993, 12(2): 138-144. (in Chinese)
- [31] 饶雨欣, 郎茂荣, 江宏, 童小青, 王勇军. 浙江天目山蝉花虫草的分离及基质栽培[J]. *浙江农业科学*, 2021, 62(6): 1097-1099.

- RAO Y X, LANG M R, JIANG H, TONG X Q, WANG Y J. Isolation and substrate cultivation of *Cordyceps cicada* in Tianmu Mountain, Zhejiang province[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2021, 62(6): 1097-1099. (in Chinese)
- [32] 李燕秋, 贺小丽, 庄在非, 贺新生. 峨眉山野生金蝉花孢梗束培养试验[J]. 微生物学杂志, 2020, 40(3): 86-92.
- LI Y Q, HE X L, ZHUANG Z F, HE X S. Coremium culture experiment of wild *Cicada* from Mt. Emei[J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(3): 86-92. (in Chinese)
- [33] 牟丹, 曾召英, 钟文琳, 周家喜, 瞿娇娇, 邹晓. 贵阳地区蝉花微生态系统中细菌种群结构与功能[J]. 微生物学报, 2021, 61(2): 469-481.
- MOU D, ZENG Z Y, ZHONG W L, ZHOU J X, QU J J, ZOU X. Bacterial community structure and function of *Cordyceps cicadae* microecosystem in Guiyang[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(2): 469-481. (in Chinese)
- [34] 韩利红, 田雪莲, 李雪梅, 谭娟, 何春萍, 刘潮. 蛹虫草基因组密码子使用偏性分析[J]. 食用菌学报, 2021, 28(2): 26-35.
- HAN L H, TIAN X L, LI X M, TAN J, HE C P, LIU C. Analysis of codon usage bias in *Cordyceps militaris*[J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(2): 26-35. (in Chinese)