



梁焱, 吴华, 韩日畴, 曹莉. 糖类对冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 芽生孢子产量及毒力的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (6): 1446–1457.

糖类对冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 芽生孢子产量及毒力的影响

梁焱^{1,2}, 吴华², 韩日畴², 曹莉^{2*}

(1. 仲恺农业工程学院, 广州 510225;

2. 广东省科学院动物研究所, 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, 广州 510260)

摘要: 冬虫夏草 (Chinese cordyceps) 是食药两用的传统名贵资源。其人工培养需要冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 的优质芽生孢子。为获得高产量及高感染力芽生孢子, 本研究测定不同糖类培养基对冬虫夏草菌芽生孢子产量及毒力 (对小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis* 幼虫的存活率、携菌率和僵虫率) 的影响。两个冬虫夏草菌株于含 6 种糖 (葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、麦芽糖、蔗糖和海藻糖) 的液体培养基中分别培养 30 d、45 d 和 60 d, 计数芽生孢子产量并将收集的孢子注射感染两个品系的小金蝠蛾 6 龄幼虫, 置于不同温度下观察幼虫的存活率、携菌率及僵虫率。结果显示: 不同糖源培养基中芽生孢子的产量差异显著, 其中含麦芽糖培养基中芽生孢子产量最高; 注射菌株和幼虫品系对被注射幼虫的存活率无显著差异; 不同糖源培养基获得的芽生孢子对蝠蛾幼虫的存活率无显著差异, 对携菌率和僵虫率产生影响; 以含麦芽糖为糖源的培养基、芽生孢子培养时间显著影响被注射幼虫的存活率与僵虫率, 其中培养 30 d 的冬虫夏草菌所注射的幼虫的存活率、僵虫率显著高于 60 d 的; 温度也显著影响被注射幼虫的存活率、僵虫率, 10℃ 的幼虫存活率和僵虫率显著高于 14℃、18℃ 的。研究结果为培养优质冬虫夏草芽生孢子, 提高被感染蝙蝠蛾幼虫僵虫率提供了参考。

关键词: 冬虫夏草; 冬虫夏草菌; 蝙蝠蛾幼虫; 人工饲养; 含糖培养基

中图分类号: Q969.97; Q965

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 06-1446-12

Influence of sugars on the yields and virulence of *Ophiocordyceps sinensis* blastospores

LIANG Yan^{1,2}, WU Hua², HAN Ri-Chou², CAO Li^{2*} (1. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, China)

Abstract: Chinese cordyceps is a traditional valuable resource for food and medicine. Artificial cultivation of Chinese cordyceps requires high-quality blastospores of *Ophiocordyceps sinensis*. In order to obtain high yield and virulence blastospores, the effects of the media containing different sugars on the yields and virulence (survival rates, fungal retention rate and mummified rate of the infected *Thitarodes* larvae) of *O. sinensis* blastospores were determined. Two *O. sinensis* strains were cultured in the liquid media with

基金项目: 广州市科技计划项目 (201604020030, 201803010087); 国家自然科学基金 (31900368); 广东省科学院“千名博士 (后) 计划”引进专项 (2019GDASYL-0103056); 广东省科学院科技发展专项 (2018GDASCX-0107)

作者简介: 梁焱, 男, 硕士研究生, 研究方向为资源昆虫、冬虫夏草研发, E-mail: viplyan@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 曹莉, 女, 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的研究, E-mail: caol@giabr.gd.cn

收稿日期 Received: 2020-07-27; 接受日期 Accepted: 2020-08-31

different sugars for 30, 45 and 60 days, respectively, and the blastospore yields were determined. These spores were used to inject the 6th instar larvae of *T. xiaojinensis*, and the survival rates, fungal retention rates and mummified rates of the infected *Thitarodes* larvae were obtained. The results showed that blastospore yields from different media was significantly different, with highest yield obtained from the medium containing maltose. Larval survival rates were not different by the injected fungal strains and larval strains. Fungal retention rates and mummified rates of the infected *Thitarodes* larvae were influenced by the blastospores from different media, but the survival rates were not much different. The fungal culture times significantly affected the larval survival and mummified rates, and the blastospores from 30 d cultures produced significantly higher rates than those from 60 d cultures from the maltose-containing cultures. The temperatures also significantly affected the survival rates and mummified rates of the injected larvae, and the larval survival and mummified rates at 10℃ were significantly higher than those at 14℃ and 18℃. The results provide a reference for producing high-quality *O. sinensis* blastospores and increasing the mummified rates of the injected larvae.

Key words: Chinese cordyceps; *Ophiocordyceps sinensis*; *Thitarodes* larvae; artificial cultivation; media containing sugars

冬虫夏草是冬虫夏草菌侵染寄主昆虫—蝙蝠蛾科 Hepialidae 幼虫, 在合适环境下形成的幼虫尸体与真菌子座的复合形态结构 (Sung *et al.*, 2007; Lo *et al.*, 2013)。由于良好的药理药效作用, 冬虫夏草被称为“中药三大宝”(人参、鹿茸和冬虫夏草)之一 (Lo *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; 丘雪红等, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; 韩日畴等, 2019)。冬虫夏草主要产于海拔 3 000 m 以上的青藏高原 (Yi *et al.*, 2011), 生长周期长, 生存条件恶劣, 因此, 野生资源极为有限 (陈仕江等, 2001)。随着“亚健康”人群的扩大, 冬虫夏草日益受到人们的青睐; 而过度采挖和气候变暖导致野生冬虫夏草处于濒危 (Zhang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016; Hopping *et al.*, 2018)。唯一选择是进行冬虫夏草人工培育 (Xia *et al.*, 2016; 丘雪红等, 2016; 韩日畴等, 2019)。

冬虫夏草菌是一种嗜低温真菌 (Dong *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2012), 其寄主蝙蝠蛾昆虫野外完成其生活史需要 3~4 年, 实验室培育也需要 1~2 年 (徐海峰, 2007; Tao *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020)。经过数十年的努力, 冬虫夏草的人工栽培取得重大突破, 包括冬虫夏草菌子实体的人工培育 (Cao *et al.*, 2015)、蝙蝠蛾昆虫低海拔规模化人工饲养 (曹莉和韩日畴, 2014; Tao *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019) 以及利用冬虫夏草菌感染蝙蝠蛾幼虫获得媲美野生的冬虫夏草 (张姝等, 2013; Zhao *et al.*, 2014; Xiao *et al.*,

2018; 韩日畴等, 2019; Li *et al.*, 2020)。目前, 冬虫夏草菌的芽生孢子和子囊孢子均用于感染蝙蝠蛾幼虫获得冬虫夏草, 芽生孢子用于注射感染 (曹莉等, 2019; Liu *et al.*, 2020), 子囊孢子用于体表感染 (杨大荣等, 1986; 韩晓然, 2020)。在实践中, 两种感染方法各有优缺点。注射感染时, 需要获得大量对蝙蝠蛾幼虫具有高侵染力的芽生孢子 (Liu *et al.*, 2020)。

为了获得高质量的冬虫夏草芽生孢子, 本研究中比较了不同糖类培养基对冬虫夏草菌芽生孢子产量以及芽生孢子对蝙蝠蛾幼虫存活率、携菌率和僵虫率的影响, 为在低海拔地区人工栽培冬虫夏草提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 冬虫夏草菌培养

冬虫夏草菌菌株 KD (分离自四川康定) 和 QH (分离自青海玉树), 经分子鉴定后 (Cao *et al.*, 2015) 保存于广东省科学院动物研究所 (原广东省生物资源应用研究所)。培养基成分如下: 糖 20 g, 马铃薯 200 g 煮汁, 蛋白胨 10 g, 大蜡螟鲜幼虫 5 g (以人工培养基饲养), 磷酸二氢钾 3 g, 七水合硫酸镁 1.5 g, 维生素 B₁ 0.02 g, 以水定容至 1 000 mL。配制好的培养基分装至 250 mL 的三角瓶中, 150 mL/瓶, 并于 121℃ 高压灭菌 30 min, 冷却后使用。本实验使用的糖类包括葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、麦芽糖、蔗糖和海

藻糖, 均为分析纯, 购自广州市普博仪器有限公司。

于超净工作台中, 将 9 ~ 13℃ 下固体 G5 培养基 (葡萄糖 20 g, 马铃薯 200 g 煮汁, 蛋白胨 10 g, 大蜡螟鲜幼虫 5 g (以人工培养基饲养), 磷酸二氢钾 3 g, 七水合硫酸镁 1.5 g, 维生素 B₁ 0.02 g, 琼脂 16 g, 以水定容至 1 000 mL) 培养 60 d 的冬虫夏草菌块 (约 1 cm³) 接种于上述液体培养基中, 置于 110 rpm、9 ~ 13℃ 摇床上培养 50 d, 收集芽生孢子作为接种源。培养的菌液以三层无菌擦镜纸过滤, 收集滤液离心 (8 000 rpm, 10℃, 15 min), 弃上清液, 重悬于无菌磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.0) 中。将收集的芽生孢子液稀释至 1.5×10^6 个/mL, 每瓶 150 mL 培养基中分别接入 1 mL 1.5×10^6 个/mL 芽生孢子液, 置于 110 rpm、9 ~ 13℃ 摇床黑暗条件下培养。每隔 10 d, 分别从培养瓶中取样 0.3 mL, 摇匀后取 10 μ L 添加到等体积的荧光 28 染色剂 (Sigma 公司, 上海) 中对冬虫夏草菌菌丝及芽生孢子进行染色, 在荧光显微镜 (Nikon, 日本) 下对芽生孢子进行观察与计数。每个处理设置 3 个重复, 持续观察至 60 d。

1.2 蝙蝠蛾幼虫的饲养

实验所用的小金蝠蛾 6 龄幼虫 YL 和 GG 品系于广东省科学院动物研究所实验室饲养, 饲养方法按照 (Tao *et al.*, 2015), 6 龄幼虫用于注射感染。

1.3 蝠蛾幼虫的侵染

以无菌 PBS 缓冲溶液稀释收集得到的芽生孢子浓度为 10^6 个/mL。注射感染蝙蝠蛾幼虫的方法按照 (曹莉等, 2019; Liu *et al.*, 2020)。利用微量注射器 (针头直径 0.06 mm) 分别对小金蝠蛾 6 龄幼虫 YL 和 GG 品系进行注射感染, 每头幼虫注射 4 μ L 芽生孢子 (芽生孢子数量为 10^6 个/mL)。注射后的蝙蝠蛾幼虫分别置于 10℃、14℃ 或 18℃ 中培养。每个处理设 60 头幼虫, 3 个重复 (共 180 头)。于 30 d 观察和记录幼虫存活率、于 60 d 观察和记录幼虫存活率和幼虫僵虫率。

分别取注射后 30 d 的幼虫血淋巴经荧光 28 染色剂染色后, 于显微镜下观察血淋巴中是否出现芽生孢子, 并计算幼虫携菌率。

1.4 统计与分析

数据以平均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{X} \pm SE$) 表示。使用 SPSS 软件 (IBM Statistics SPSS 25.0) 分析。符

合正态分布 (Normality Plots with Tests) 和方差齐性 (Test of Homogeneity of Variances) 的数据进行单因素方差分析 (One Way ANOVA); 若方差存在显著差异, 则采用 Tukey 法进行多重比较。对于不符合上述条件的数据则进行非参数检验 (Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney U test 检验)。显著水平设置为 $P = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 糖类对冬虫夏草菌芽生孢子产量的影响

加入不同糖类的培养基中, 冬虫夏草菌 (KD、QH 菌株) 在不同培养时间的芽生孢子产量不同 (图 1、图 2)。含麦芽糖培养基中芽生孢子产量显著高于其它糖类, 果糖的产量最低; 最佳产量处于培养时间 30 ~ 40 d; 其生长曲线大致分为 3 个阶段: 0 ~ 15 d 的缓慢生长阶段, 15 ~ 35 d 的指数生长阶段, 35 ~ 60 d 的缓慢下降生长阶段。

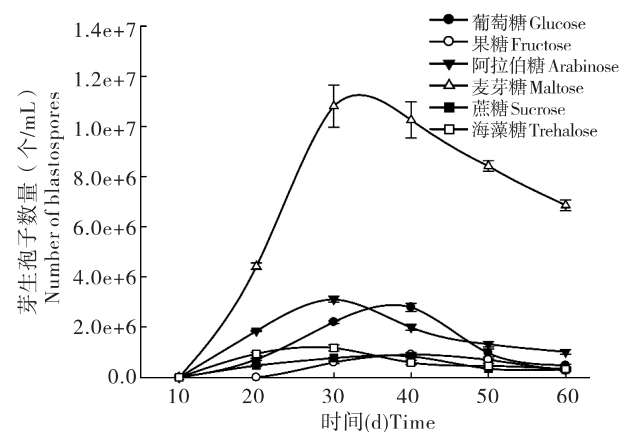


图 1 冬虫夏草菌 (KD 菌株) 9 ~ 13℃ 下不同含糖培养基中芽生孢子生长曲线

Fig. 1 Growth curve of blastospores of *Ophiocordyceps sinensis* (KD) in the media containing different sugars at 9 ~ 13℃

含糖不同的培养基中芽生孢子在 30 d 时的产量差异显著 ($F_{11,24} = 414.719$, $P = 0.000$) (图 3)。KD 菌株在不同培养基中的芽生孢子产量均显著高于 QH 菌株; 不论是在 KD 或 QH 菌株中, 含麦芽糖培养基中芽生孢子产量均显著高于其它糖类; 对于 KD 菌株, 含阿拉伯糖和葡萄糖的培养基中芽生孢子产量无显著差异, 但显著高于含果糖、蔗糖和海藻糖培养基中的孢子产量; 含海藻糖培养基中收获的芽生孢子数量显著高于含果糖和蔗糖培养基的, 蔗糖和果糖间差异不显著。对于 QH 菌

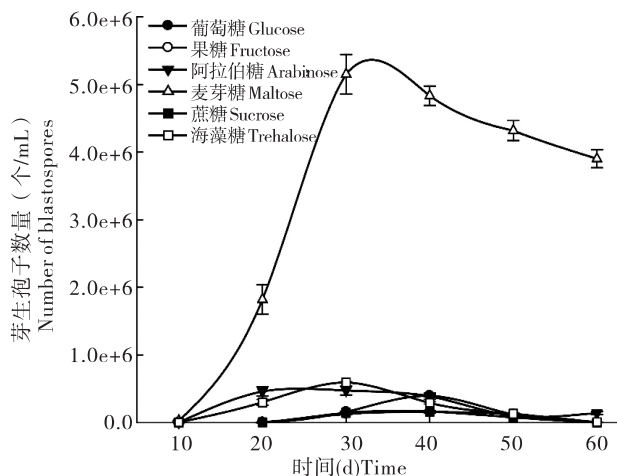


图2 冬虫夏草菌 (QH 菌株) 9~13℃ 下于不同含糖培养基中芽生孢子生长曲线

Fig. 2 Growth curve of blastospores of *Ophiocordyceps sinensis* (QH) in the media containing different sugars at 9~13℃

株, 含阿拉伯糖培养基中芽生孢子产量显著高于含葡萄糖、果糖、蔗糖、海藻糖培养基的; 含葡萄糖、果糖、蔗糖或海藻糖培养基中芽生孢子数量差异不显著。因此, 麦芽糖是支持冬虫夏草菌芽生孢子生长的最优糖源; KD 菌株芽生孢子在不同培养基中的产量均高于 QH 菌株。

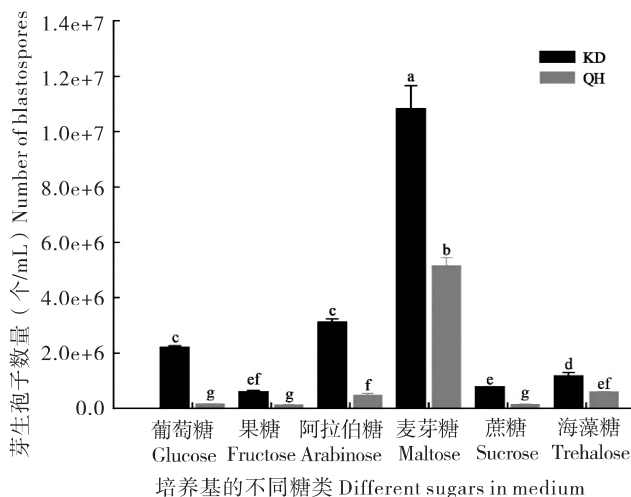


图3 两种冬虫夏草菌株 (KD 和 QH) 9~13℃ 下于不同糖类培养基中 30 d 的芽生孢子产量

Fig. 3 Yields of *Ophiocordyceps sinensis* blastospores (KD and QH) in the media containing different sugars at 30 d at 9~13℃

注: 柱子上面不同字母表示处理间芽生孢子产量在 5% 水平差异显著, 下同。Note: Columns with different letters indicate significant differences at 5% level among the yields of blastospores. The same as below.

2.2 不同糖培养基培养 30 d 的冬虫夏草菌芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫存活率、携菌率及僵虫率的影响

含不同糖培养基培养 30 d 的芽生孢子 (KD、QH 菌株) 以 10^6 个/mL 浓度注射小金蝠蛾幼虫的两个品系, 被注射幼虫置于 10℃ 下饲养 30 d 的存活率、携菌率, 60 d 的僵虫率见图 4~6 (KD、QH 菌株的含果糖培养基及 QH 菌株的含葡萄糖、蔗糖培养基培养 30 d 达不到注射浓度)。含不同糖培养基培养 30 d 的芽生孢子 (KD 菌株) 注射后幼虫的存活率 (图 4-A) 不存在显著差异 ($F_{9,20} = 0.966$, $P = 0.495$), 而 QH 菌株 (图 4-B) 的存活率存在显著差异 ($F_{5,12} = 4.089$, $P = 0.021$), 海藻糖的 YL 品系幼虫存活率显著低于阿拉伯糖、麦芽糖 (YL 和 GG 品系) 及海藻糖 GG 品系的。其携菌率均存在显著差异 (KD 菌株, 图 5-A: $H = 19.483$, $P = 0.021$; QH 菌株, 图 5-B: $H = 11.940$, $P = 0.036$), KD 菌株含麦芽糖培养基 (YL 及 GG 品系幼虫) 和含海藻糖培养基的 YL 品系幼虫携菌率达到 100%, 而 QH 菌株仅有含麦芽糖培养基的 GG 品系幼虫携菌率达到 100%。其僵虫率均存在显著差异 (KD 菌株, 图 6-A: $F_{9,20} = 7.711$, $P = 0.000$; QH 菌株, 图 6-B: $F_{5,12} = 4.160$, $P = 0.020$)。

2.3 不同糖培养基培养 45 d 的冬虫夏草菌芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫存活率、携菌率及僵虫率的影响

含不同糖培养基培养 45 d 的芽生孢子 (KD、QH 菌株) 以 10^6 个/mL 浓度注射两个品系的小金蝠蛾幼虫, 被注射幼虫置于 10℃ 下饲养 30 d 的存活率、携菌率, 60 d 的僵虫率见图 7~图 9。含不同糖培养基培养 30 d 的芽生孢子 (KD、QH 菌株) 注射后幼虫的存活率 (图 7-A、图 7-B) 均不存在显著差异 (KD 菌株: $H = 15.328$, $P = 0.168$; QH 菌株: $F_{11,24} = 1.695$, $P = 0.135$)。其携菌率 (图 8-A、图 8-B) 也不存在显著差异 (KD 菌株: $H = 14.842$, $P = 0.190$; QH 菌株: $H = 18.868$, $P = 0.063$)。KD 菌株的僵虫率 (图 9-A) 也不存在显著差异 ($H = 12.751$, $P = 0.310$), 而 QH 菌株 (图 9-B) 的僵虫率存在显著差异 ($H = 21.870$, $P = 0.025$)。

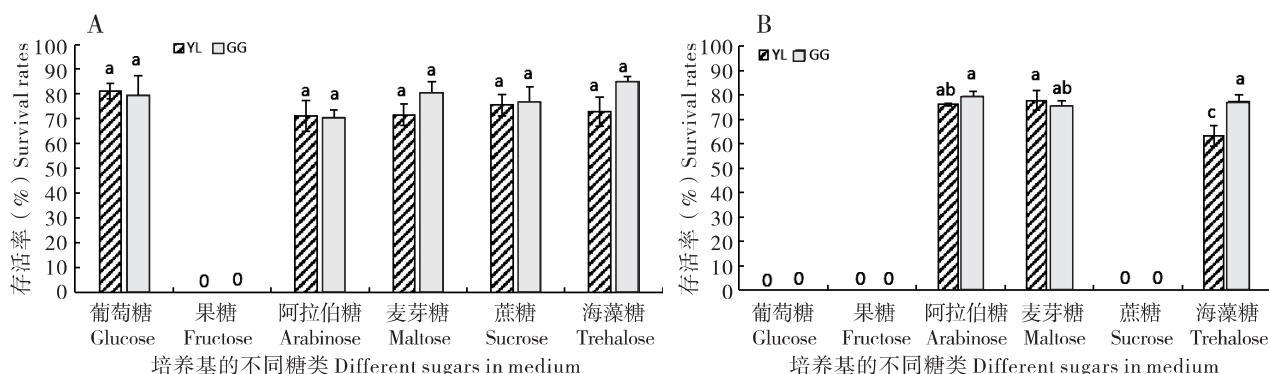


图4 不同糖培养基培养30 d的冬虫夏草菌KD (A)、QH (B) 芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫 (YL、GG 品系) 存活率的影响

Fig. 4 Survival rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae challenged with *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores from the media containing different sugars after 30 days

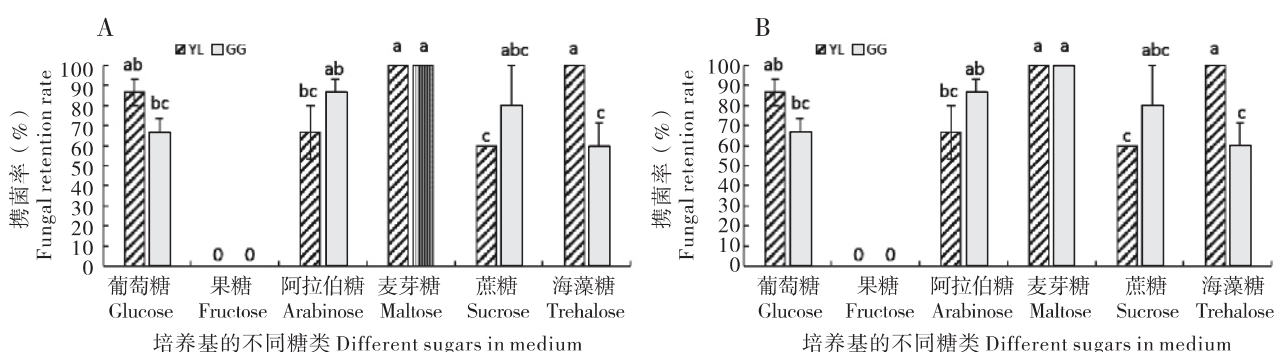


图5 不同糖培养基培养30 d的冬虫夏草菌KD (A)、QH (B) 芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫 (YL、GG 品系) 携菌率的影响

Fig. 5 Fungal retention rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae challenged with *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores from the media containing different sugars after 30 days

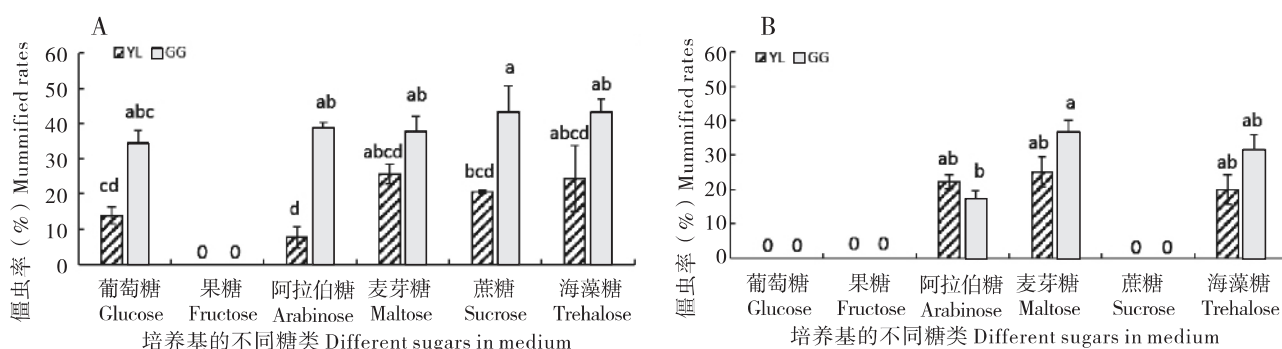


图6 不同糖培养基培养30 d的冬虫夏草菌KD (A)、QH (B) 芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫 (YL、GG 品系) 僵虫率的影响

Fig. 6 Mummified rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae challenged with *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores from the media containing different sugars after 30 days

2.4 不同糖培养基培养60 d的冬虫夏草菌芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫存活率、携菌率及僵虫率的影响

含不同糖培养基培养60 d的芽生孢子 (KD、QH 菌株) 以 10^6 个/mL 浓度注射两个品系的小金

蝠蛾幼虫, 被注射幼虫置于 10°C 下饲养30 d的存活率、携菌率, 60 d的僵虫率见图10~图12 (QH 菌株的含阿拉伯糖培养基培养60 d所剩芽生孢子不够注射使用量)。含不同糖培养基培养60 d的芽生孢子 (KD、QH 菌株) 注射后幼虫的存活率

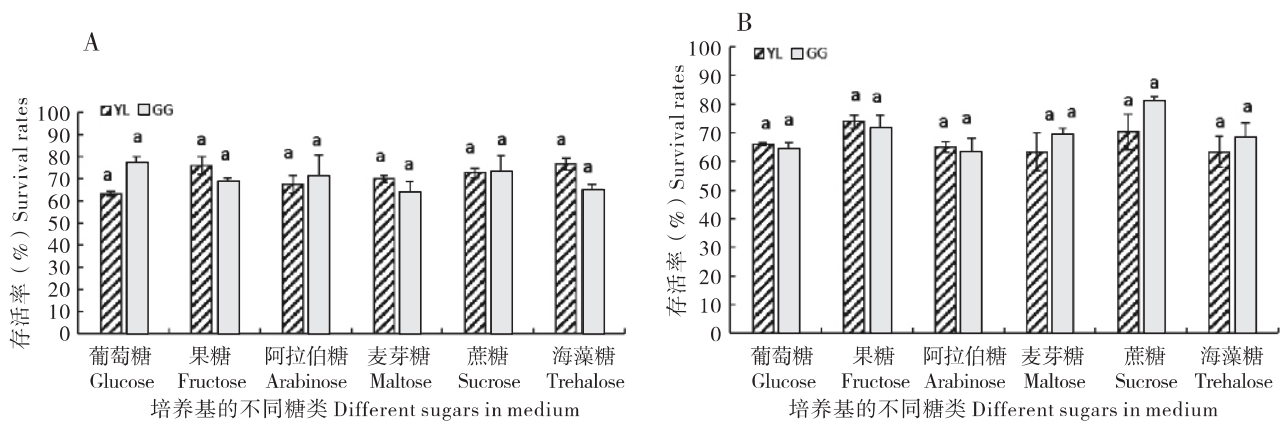


图 7 不同糖培养基培养 45 d 的冬虫夏草菌 KD (A)、QH (B) 芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫 (YL、GG 品系) 存活率的影响

Fig. 7 Survival rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae challenged with *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores from the media containing different sugars after 45 days

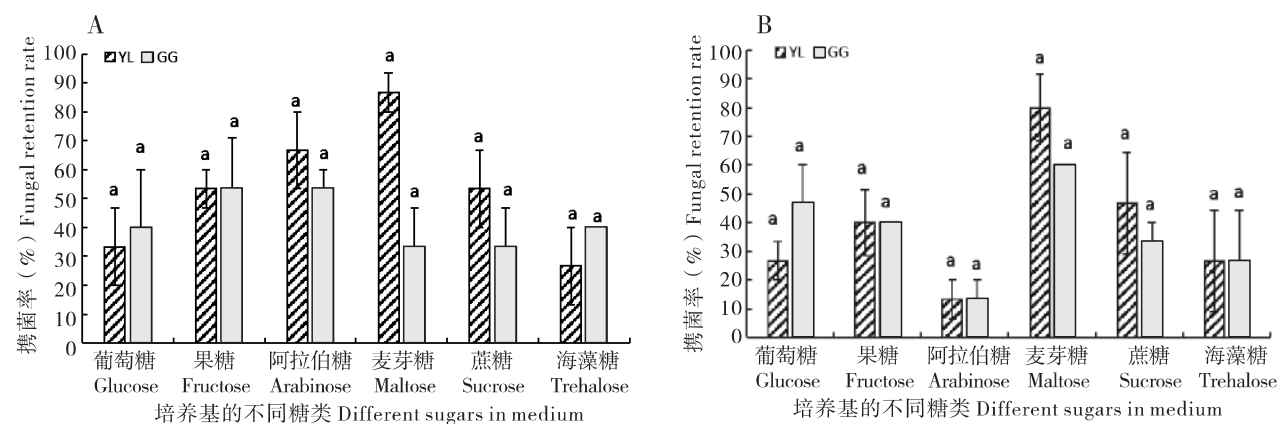


图 8 不同糖培养基培养 45 d 的冬虫夏草菌 KD (A)、QH (B) 芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫 (YL、GG 品系) 携菌率的影响

Fig. 8 Fungal retention rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae challenged with *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores from the media containing different sugars after 45 days

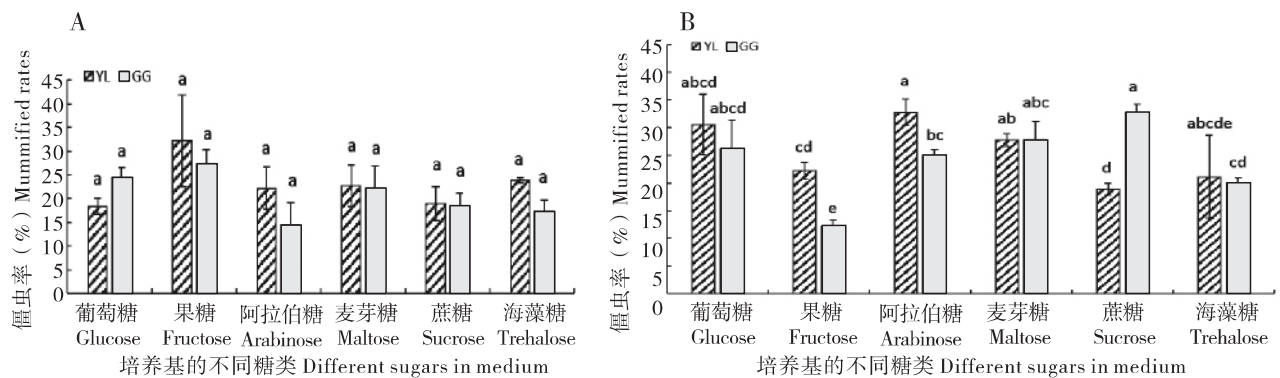


图 9 不同糖培养基培养 45 d 的冬虫夏草菌 KD (A)、QH (B) 芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫 (YL、GG 品系) 僵虫率的影响

Fig. 9 Mummified rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae challenged with *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores from the media containing different sugars after 45 days

(图 10 - A、图 10 - B) 均不存在显著差异 (KD 菌株: $F_{11,24} = 2.091$, $P = 0.063$; QH 菌株: $H = 15.403$, $P = 0.080$)。KD 菌株的携菌率 (图 11 - A) 存在显著差异 (KD 菌株: $H = 23.589$, $P = 0.015$), 其中 YL 品系幼虫中麦芽糖、蔗糖和海藻糖的携菌率达到 100%, GG 品系幼虫中果糖、阿

拉伯糖和麦芽糖的携菌率达到 100%。而 QH 菌株含不同糖培养基的携菌率 (图 11 - B) 差异不显著 ($H = 13.677$, $P = 0.134$)。其僵虫率均存在显著差异 (KD 菌株, 图 12 - A: $H = 25.545$, $P = 0.008$; QH 菌株, 图 12 - B: $H = 23.587$, $P = 0.005$)。

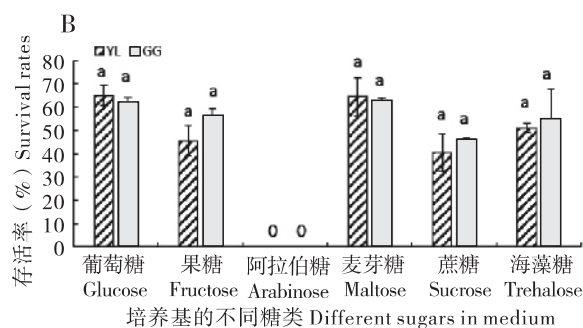
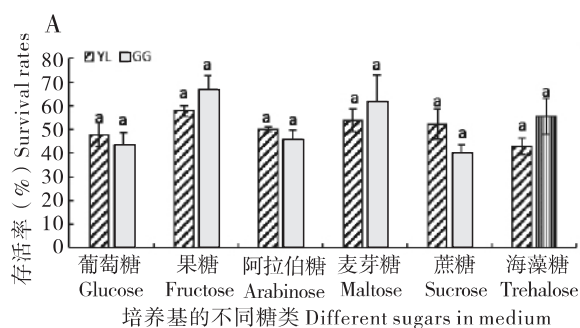


图 10 不同糖培养基培养 60 d 的冬虫夏草菌 KD (A)、QH (B) 芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫 (YL、GG 品系) 存活率的影响

Fig. 10 Survival rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae challenged with *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores from the media containing different sugars after 60 days

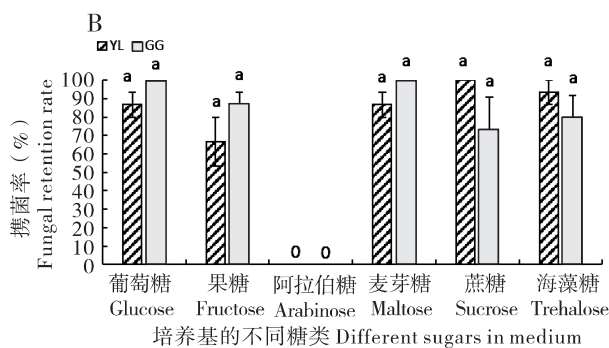
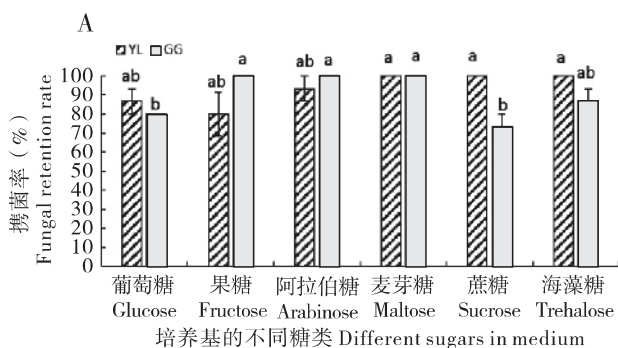


图 11 不同糖培养基培养 60 d 的冬虫夏草菌 KD (A)、QH (B) 芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫 (YL、GG 品系) 携菌率的影响

Fig. 11 Fungal retention rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae challenged with *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores from the media containing different sugars after 60 days

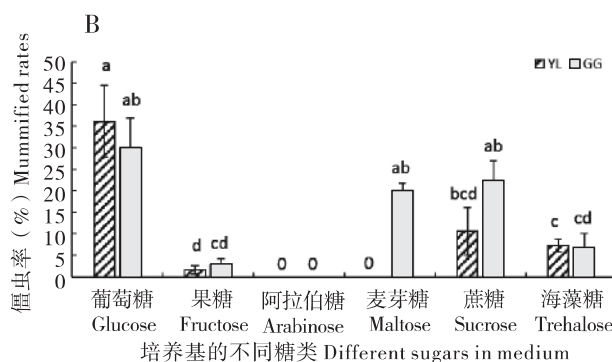
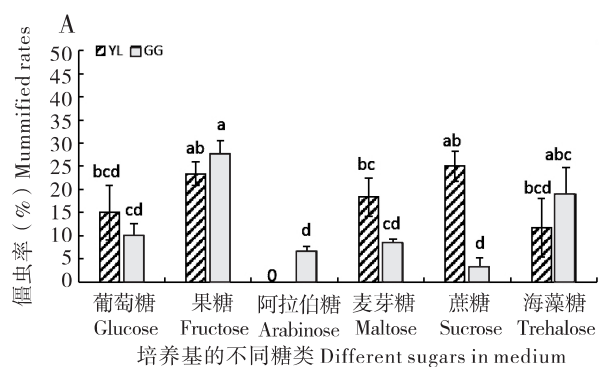


图 12 不同糖培养基培养 60 d 的冬虫夏草菌 KD (A)、QH (B) 芽生孢子对注射后的小金蝠蛾幼虫 (YL、GG 品系) 僵虫率的影响

Fig. 12 Mummified rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae challenged with *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores from the media containing different sugars after 60 days

2.5 含麦芽糖培养基培养的冬虫夏草菌对蝙蝠蛾幼虫存活率的影响

含麦芽糖培养基培养不同时间的芽生孢子 (KD 和 QH 菌株) 以 10^6 个/mL 浓度注射小金蝠蛾幼虫的两个品系, 被注射幼虫置于 10℃、14℃ 和 18℃ 下饲养 30 d 的存活率见表 1。在同一温度下, 无论是注射培养 30 d、45 d、60 d 的 KD 还是 QH 菌株, 两个蝙蝠蛾品系的幼虫于 30 d 的存活率均无显著差异 (表 1), 即 30 d: (10℃, $F_{3,8}=0.966$, $P=0.454$; 14℃, $F_{3,8}=1.109$, $P=0.401$; 18℃, $F_{3,8}=1.594$, $P=0.266$)、45 d: (10℃, $F_{3,8}=0.664$, $P=0.597$; 14℃, $F_{3,8}=2.446$, $P=0.139$; 18℃, $F_{3,8}=1.411$, $P=0.309$)、60 d: (10℃, $F_{3,8}=0.401$, $P=0.756$; 14℃, $F_{3,8}=$

3.612, $P=0.065$; 18℃, $F_{3,8}=1.618$, $P=0.260$)。在其它条件相同下, 不同温度间的蝙蝠蛾幼虫于 30 d 后的存活率部分存在显著差异 (表 2)。10℃ 下的蝙蝠蛾幼虫存活率优于 14℃、18℃ 的; 不同芽生孢子培养时间对注射后的蝙蝠蛾幼虫在 10℃、14℃、18℃ 下于 30 d 的存活率存在差异 (10℃: $F_{2,33}=9.820$, $P=0.000$; 14℃: $F_{2,33}=12.793$, $P=0.000$; 18℃: $F_{2,33}=26.403$, $P=0.000$), 30 d 的芽生孢子培养时间对注射后的蝙蝠蛾幼虫存活率显著优于 60 d 的。因此, 不同冬虫夏草菌株未显著影响在相同饲养温度下的两种小金蝠蛾品系的存活率; 但不同饲养温度或不同芽生孢子的收获时间显著影响两种小金蝠蛾幼虫的存活率。

表 1 含麦芽糖培养基培养 30 d、45 d、60 d 的冬虫夏草菌 (KD 和 QH 菌株) 注射小金蝠蛾幼虫 (YL 和 GG 品系) 在不同温度下的存活率

Table 1 Survival rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae challenged with *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores from the maltose – containing cultures after 30 d, 45 d, 60 d at different temperatures

芽孢培养时间 (d) Culture times of blastospores	菌株 Fungal strains	幼虫品系 Insect strains	存活率 (%) Survival rates		
			10℃	14℃	18℃
30	KD	YL	71.67 ± 4.19 aA	52.22 ± 1.47 aB	49.44 ± 5.80 aB
		GG	80.56 ± 4.55 aA	62.78 ± 5.80 aA	63.89 ± 9.88 aA
	QH	YL	77.78 ± 4.01 aA	53.89 ± 6.55 aB	47.78 ± 2.00 aB
		GG	75.56 ± 2.00 aA	60.56 ± 3.89 aB	55.00 ± 3.47 aB
45	KD	YL	70.00 ± 1.67 aA	58.89 ± 5.80 aAB	46.67 ± 1.92 aB
		GG	63.89 ± 4.84 aA	45.56 ± 3.64 aAB	39.44 ± 5.30 aB
	QH	YL	63.33 ± 6.74 aA	58.33 ± 3.33 aA	51.67 ± 2.55 aA
		GG	69.44 ± 2.00 aA	54.44 ± 2.00 aA	51.11 ± 7.22 aA
60	KD	YL	53.89 ± 4.84 aA	40.56 ± 1.47 aA	23.33 ± 2.89 aB
		GG	61.67 ± 11.34 aA	45.00 ± 3.47 aAB	25.00 ± 5.09 aB
	QH	YL	64.44 ± 8.07 aA	36.67 ± 1.67 aB	23.33 ± 6.67 aB
		GG	62.78 ± 1.11 aA	47.78 ± 3.09 aB	36.11 ± 3.89 aB

注: 对每一列 (同一温度、同一芽孢培养时间) 以及每一行 (注射幼虫置于不同温度下) 的小金蝠蛾幼虫存活率进行方差分析。小写字母表示同一列分析, 大写字母表示同一行分析, 不同字母表示差异显著。下同。Note: ANOVA was performed on the survival rates of *Thitarodes xiaojinensis* larvae in each column (same culture time of blastospores at the same temperature) and each row (the injected larvae cultured at different temperatures). Lowcase letters are used for the analysis of the same columns and capital letters for the analysis of the same lines. The columns or lines with the same letters indicate no significant differences. The same as below.

2.6 含麦芽糖培养基培养的冬虫夏草菌对蝙蝠蛾幼虫僵虫率的影响

结果分析表明含麦芽糖的冬虫夏草菌 (KD、

QH) 注射蝙蝠蛾幼虫 (YL 和 GG) 在 10℃ 的僵虫率显著高于 14℃、18℃ (表 3), 14℃ 和 18℃ 下所有幼虫的僵虫率为 0。不同时间收获的冬虫夏草菌

表 2 含麦芽糖培养基培养 30 d、45 d、60 d 的冬虫夏草菌 (KD 和 QH 菌株) 注射小金蝠蛾幼虫 (YL 和 GG 品系) 在不同温度下的存活率方差分析结果

Table 2 Analysis of variance analysis of survival rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae challenged with *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores from the maltose-containing cultures after 30 d, 45 d, 60 d at different temperatures

芽生孢子培养时间 (d)	菌株	幼虫品系	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	差异性
Culture time of blastospores	Fungal strains	Insect strains	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value	Significance
30	KD	YL	$F_{2,6} = 11.400$	0.009	*
		GG	$F_{2,6} = 1.959$	0.221	—
	QH	YL	$F_{2,6} = 11.975$	0.008	*
		GG	$F_{2,6} = 10.881$	0.010	*
45	KD	YL	$F_{2,6} = 10.185$	0.012	*
		GG	$F_{2,6} = 7.490$	0.023	*
	QH	YL	$F_{2,6} = 1.632$	0.272	—
		GG	$F_{2,6} = 4.754$	0.058	—
60	KD	YL	$F_{2,6} = 20.736$	0.002	*
		GG	$F_{2,6} = 6.067$	0.036	*
	QH	YL	$F_{2,6} = 11.747$	0.008	*
		GG	$F_{2,6} = 20.673$	0.002	*

注: * 表示存在显著差异; — 表示不存在显著差异。Note: * Significant differences; — No significant differences.

表 3 小金蝠蛾幼虫 (YL 和 GG 品系) 被注射麦芽糖培养基培养 30 d、45 d、60 d 的冬虫夏草菌 (KD 和 QH 菌株) 芽生孢子后于 10℃、14℃、18℃ 下 60 d 的僵虫率

Table 3 Mummified rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae after 60 days at 10℃、14℃、18℃ after challenged with 30 d、45 d、60 d old *Ophiocordyceps sinensis* (KD and QH) blastospores cultured with the medium containing maltose

芽生孢子培养时间 (d)	菌株	幼虫品系	僵虫率 (%) Mummified rates		
			10℃	14℃	18℃
30	KD	YL	25.56 ± 2.78 aA	0 aB	0 aB
		GG	37.78 ± 4.34 aA	0 aB	0 aB
	QH	YL	25.00 ± 4.41 aA	0 aB	0 aB
		GG	36.67 ± 3.47 aA	0 aB	0 aB
45	KD	YL	22.78 ± 4.34 aA	0 aB	0 aB
		GG	22.22 ± 4.75 aA	0 aB	0 aB
	QH	YL	27.78 ± 1.11 aA	0 aB	0 aB
		GG	27.78 ± 3.38 aA	0 aB	0 aB
60	KD	YL	18.33 ± 4.19 abA	0 aB	0 aB
		GG	8.33 ± 0.96 bA	0 aB	0 aB
	QH	YL	0 cA	0 aA	0 aA
		GG	20.00 ± 1.67 aA	0 aB	0 aB

(KD 菌株) 芽生孢子注射的小金蝠蛾幼虫的僵虫率间存在显著差异 ($F_{5,12} = 6.340$, $P = 0.004$) (图 13); 培养 30 d 的冬虫夏草菌 (KD) 芽生孢子注射的小金蝠蛾幼虫 YL 品系的僵虫率与培养 60 d 的芽生孢子无显著差异, 但培养 30 d 的芽生孢子注射的小金蝠蛾幼虫 GG 品系的僵虫率显著高于培养 60 d 芽生孢子的; 而培养 30 d 和 45 d 的芽生孢子注射的两种小金蝠蛾幼虫品系的僵虫率之间未见显著差异 (图 13)。

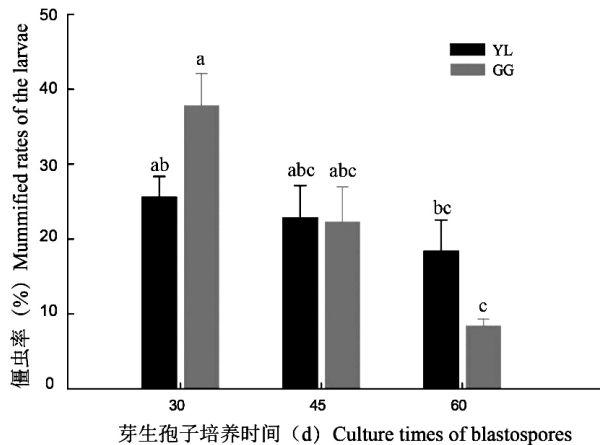


图 13 小金蝠蛾幼虫 (YL 和 GG 品系) 被注射麦芽糖培养基培养 30 d、45 d、60 d 的冬虫夏草菌 (KD 菌株) 芽生孢子后于 10℃ 下 60 d 的僵虫率

Fig. 13 Mummified rates of the *Thitarodes xiaojinensis* (YL and GG) larvae at 60 days at 10℃ after challenged with 30 d, 45 d and 60 d old *Ophiocordyceps sinensis* (KD) blastospores cultured with the medium containing maltose

3 结论与讨论

冬虫夏草菌是寄生于蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的一种药用真菌 (刘丽娟等, 2004; 董彩虹等, 2016)。冬虫夏草菌入侵其寄主蝠蛾幼虫的相关机制尚未明了 (Meng *et al.*, 2015; Rao *et al.*, 2019)。体表、针刺、涂抹、喂食、浸泡、喷雾等方法常用于感染蝙蝠蛾幼虫 (杨大荣等, 1986; 王忠等, 2001; 廖志勇, 2005; 涂永勤等, 2010a), 但是仍存在携菌率低、死亡率高及僵虫率低等问题 (韩日畴等, 2019)。Liu 等 (2020) 采用微注射芽生孢子感染蝙蝠蛾幼虫的方法, 极大地提高了幼虫携菌率。

不同真菌所需的最佳糖源不同, 如蛹虫草 *Cordyceps militaris* 的最佳糖源为蔗糖 (杨心如等, 2019; 杨婷婷, 2019); 双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* 的最佳糖源为麦芽糖 (张捷, 2016); 刘永霞

(2004) 认为冬虫夏草菌菌丝生长的最佳糖源为葡萄糖; 王爽等 (2013) 研究表明葡萄糖或麦芽糖对球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 的生长和产孢明显优于其它糖源。赵秀芳 (2005) 认为白灵菇 *Pleurotus nebrodensis* 菌丝生长的最适糖源是麦芽糖和蔗糖, 而牛宇等 (2019) 表明白灵菇菌丝生长的最佳糖源为葡萄糖、麦芽糖, 以甘露醇和可溶性淀粉为糖源时发酵液中获得的菌丝干重最大。本次研究结果显示含不同糖类的培养基对冬虫夏草菌芽生孢子产量存在显著差异, 其中麦芽糖为最优糖源; 然而, 芽生孢子生长对糖类的最优选择并不等于子实体生长的糖选择, 含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明显优于含麦芽糖培养基的 (陶海平等, 2020)。

王忠等 (2001) 表明蝙蝠蛾幼虫的饲养温度应该控制在 6 ~ 12℃, 而王宏生 (2002) 则认为蝙蝠蛾幼虫的最佳饲养温度为 10 ~ 15℃。被冬虫夏草菌感染后的蝙蝠蛾幼虫, 在不同的温度、湿度和不同的光照条件下, 其子实体形成也存在差异 (李少松, 2009; 涂永勤等, 2010b)。曹莉等 (2019) 研究表明, 4℃ 左右低温可以刺激被冬虫夏草菌感染后的蝙蝠蛾幼虫子实体形成。本实验发现 10℃ 较 14℃、18℃ 适合小金蝠蛾幼虫的生存, 而高温大大降低小金蝠蛾幼虫的僵虫率, 甚至导致其死亡率升高。需要指出, 本研究主要是测定不同参数培养的冬虫夏草芽生孢子对小金蝠蛾存活率和僵虫率的影响, 所获结果显示注射不同冬虫夏草菌株未显著影响在相同饲养温度下的两种小金蝠蛾品系的存活率和僵虫率, 不同饲养温度或不同芽生孢子的收获时间显著影响两种小金蝠蛾幼虫的存活率和僵虫率, 但是获得的蝙蝠蛾幼虫存活率和僵虫率并非最优。

本实验中注射分离自四川和青海的冬虫夏草菌株均未显著影响在相同饲养温度下的小金蝠蛾两个品系的存活率, 说明菌株和寄主昆虫之间未必存在明显的专化性, 但需要在今后的研究中进一步验证。不同芽生孢子的收获时间显著影响小金蝠蛾两个品系幼虫的存活率和僵虫率, 具体原因仍有待研究。目前未见有不同时间收获的冬虫夏草菌芽生孢子注射蝙蝠蛾幼虫的报道。不同糖代谢过程形成的芽生孢子显著影响其与寄主昆虫相关作用的机理值得进一步研究。本实验的幼虫存活率比较低, 可能与注射的幼虫龄期有关。结果发现, 培养 30 ~ 45 d 的冬虫夏草菌收集的芽生

孢子为注射感染小金蝠蛾幼虫的最佳芽生孢子，而培养 60 d 的冬虫夏草菌芽生孢子似乎老化，有可能降低僵虫率。

本研究结果为培养优质冬虫夏草芽生孢子，提高被侵染蝙蝠蛾幼虫存活率、携菌率和僵虫率提供了参考。

参考文献 (References)

- Cao L, Han RC. Artificial cultivation of host insects of *Ophiocordyceps sinensis* in low altitude areas [P]. Chinese Patent Application, No. ZL201410413333. 7. 2014. [曹莉, 韩日畴. 一种冬虫夏草寄主昆虫蝙蝠蛾的人工低海拔饲养方法 [P]. 专利号: ZL201410413333. 7. 2014]
- Cao L, Liu GQ, Wu H, et al. A method for obtaining Chinese cordyceps by infecting host insect *Hepidia* larvae with *Ophiocordyceps sinensis* [P]. Chinese Patent Application, No. 201910176984. 1. 2019. [曹莉, 刘桂清, 吴华, 等. 一种中国被毛孢感染寄主昆虫蝙蝠蛾幼虫获得冬虫夏草的方法 [P]. 申请号: 201910176984. 1. 2019]
- 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): 1017–1022.
- Chen LH, Wu Y, Guan YM, et al. Analysis of the high-performance liquid chromatography fingerprints and quantitative analysis of multicomponents by single marker of products of fermented *Cordyceps sinensis* [J]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018, 6: 1–9.
- Chen SJ, Yin DH, Dan Z, et al. Ecological investigation of *Cordyceps sinensis* in Naqu Tibet China [J]. *Journal of Southwest Agricultural University* (Natural Science Edition), 2001, 23 (4): 289–296. [陈仕江, 尹定华, 丹增, 等. 中国西藏那曲冬虫夏草的生态调查 [J]. 西南农业大学学报 (自然科学版), 2001, 23 (4): 289–296]
- Dong CH, Li WJ, Li ZZ, et al. *Cordyceps* industry in China: Current status, challenges and perspectives – Jinhu declaration for *Cordyceps* industry development [J]. *Mycosystema*, 2016, 35 (1): 1–15. [董彩虹, 李文佳, 李增智, 等. 我国虫草产业发展现状、问题及展望 – 虫草产业发展金湖宣言 [J]. 菌物学报, 2016, 35 (1): 1–15]
- Dong CH, Yao YJ. Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2012, 113 (4): 474–479.
- Dong CH, Yao YJ. On the reliability of fungal materials used in studies on *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011, 38: 1027–1035.
- Gao CJ. Advances in research of the artificial cultivation of *Ophiocordyceps sinensis* in China [J]. *Critical Review in Biotechnology*, 2014, 34 (3): 233–243.
- 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]
- Han XR. Analysis of larvae of bat moth infected with *Ophiocordyceps sinensis* indoors [J]. *Village Technology*, 2020, 7: 105–106. [韩晓然. 冬虫夏草菌室内侵染蝙蝠蛾幼虫分析 [J]. 乡村科技, 2020, 7: 105–106]
- Hopping KA, Chignell SM, Lambin EF. The demise of caterpillar fungus in the Himalayan region due to climate change and overharvesting [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115: 11489–11494.
- Li SS. Studies on the Stroma Development of *Cordyceps sinensis* and the Molecular Identification of its Host Species [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2009. [李少松. 冬虫夏草子座发育观察及其寄主蝠蛾种质资源分子鉴别方法的研究 [D]. 广州: 中山大学, 2009]
- Li WJ, Wei RS, Xia JM, et al. *Ophiocordyceps sinensis* in the intestines of *Hepialus* larvae [J]. *Mycosystema*, 2016, 35: 450–455.
- Li WJ, Xia JM, Li QP, et al. Developmental recording of the ghost-moth larvae after *ex situ* infection by *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Science China Life Sciences*, 2020, 63 (7): 1093–1095.
- Li X, Liu Q, Li WJ, et al. A breakthrough in the artificial cultivation of Chinese cordyceps on a large-scale and its impact on science, the economy, and industry [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 39 (2): 181–191.
- Li Y, Wang XL, Jiao L, et al. A survey of the geographic distribution of *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Journal of Microbiology*, 2011, 49: 913–919.
- Liao ZY. Study on bacterial contamination of *Cordyceps sinensis* [J]. *Edible Fungi*, 2005, 6: 18. [廖志勇. 冬虫夏草的染菌技术研究 [J]. 食用菌, 2005, 6: 18]
- Liu GQ, Cao L, Rao ZC, et al. Identification of the genes involved in growth characters of medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis* based on *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104: 2663–2674.
- Liu LJ, Ma SY, Yuan BR. Pharmacological effects and clinical applications of Bailing capsule [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2004, 26: 493–496. [刘丽娟, 马世尧, 袁宝荣. 百令胶囊的药理作用及临床应用 [J]. 中成药, 2004, 26: 493–496]
- Liu Y, Wang J, Wang W, et al. The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis* [J]. *Evidence Based Complementary & Alternative Medicine*, 2015, 2: 1–12.
- Liu YX. *Ophiocordyceps sinensis*—Research on the Liquid Fermentation of Trichosporium in China. In: Life Science and Microbiology Album [C]. Hubei Science and Technology Association, 2004: 39–41. [刘永霞. 冬虫夏草无性型——中国被毛孢液体发酵研究. 见: 生命科学与微生物专辑 [C]. 湖北省科学技术协会, 2004: 39–41]
- Liu YX. The Biological Characteristics, Domestication, Mycelium Fermentation of *Cordyceps sinensis* Anamorph [D]. Guiyang: Guizhou University, 2004. [刘永霞. 冬虫夏草无性型中国被毛孢生物学特性及驯化、菌丝体发酵研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2004]
- Lo HC, Hsieh C, Lin FY, et al. A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in Dong-Chong Xia Cao and related bioactive ingredients [J]. *Journal of Traditional and*

- Complementary Medicine, 2013, 3 (1): 16–32.
- Meng Q, Yu HY, Zhang H, et al. Transcriptomic insight into the immune defenses in the ghost moth, *Hepialus xiaojinensis*, during an *Ophiocordyceps sinensis* fungal infection [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2015, 64: 1–15.
- Niu Y, Meng QX, Nie JJ, et al. Effects of different carbon sources on the mycelial growth of seven *Pleurotus nebrodensis* varieties [J]. *Edible Fungi of China*, 2017, 36 (6): 27–32. [牛宇, 蒙秋霞, 聂建军, 等. 不同碳源对 7 个白灵菇品种菌丝生长的影响 [J]. 中国食用菌, 2017, 36 (6): 27–32]
- 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): 1–22. [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): 1–22]
- Rao ZC, Cao L, Wu H, et al. Comparative transcriptome analysis of *Thitarodes armoricanus* in response to the entomopathogenic fungi *Paecilomyces hepiali* and *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Insects*, 2020, 11 (1): 4. doi: 10.3390/insects11010004.
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the *Clavicipitaceous fungi* [J]. *Studies in Mycology*, 2007, 57: 5–59.
- Tao HP, Cao L, Han RC. Influence of medium components and plant growth regulators on artificial production of fruiting bodies of *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2020, 42 (2): 274–281. [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]
- Tao Z, Cao L, Zhang Y, et al. Laboratory rearing of *Thitarodes armoricanus* and *Thitarodes jianchuanensis* (Lepidoptera: Hepialidae), hosts of the Chinese medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2016, 109 (1): 176–181.
- Tu YQ, Zhang DL, Zeng W, et al. An experiment of infecting *Hepialus* larvae with *Cordyceps sinensis* [J]. *Edible Fungi*, 2010a, 3: 19–20. [涂永勤, 张德利, 曾伟, 等. 蝠蛾属幼虫感染冬虫夏草菌的实验研究 [J]. 食用菌, 2010a, 3: 19–20]
- Tu YQ, Zhang DL, Zeng W, et al. Effect of environmental factors on the formation of fruiting bodies of *Cordyceps sinensis* [J]. *Edible Fungi of China*, 2010b, 9 (2): 24–25. [涂永勤, 张德利, 曾伟, 等. 环境因子对冬虫夏草子实体生长发育的影响 [J]. 中国食用菌, 2010b, 9 (2): 24–25]
- Wang HS. Preliminary study on artificial breeding technology of Chinese cordyceps bat Moth [J]. *Insect Knowledge*, 2002, 39 (2): 144–146. [王宏生. 冬虫夏草蝙蝠蛾人工饲养技术的初步研究 [J]. 昆虫知识, 2002, 39 (2): 144–146]
- Wang S, Li XM, Liu CL, et al. Effects of different carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Beauveria bassiana* [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2013, 8: 47–50. [王爽, 李新民, 刘春来, 等. 不同碳、氮源对球孢白僵菌生长及产孢的影响 [J]. 黑龙江农业科学, 2013, 8: 47–50]
- Wang Z, Ma QL, Qiao ZQ, et al. Fully artificial feeding technology of the host insect Chinese cordyceps in Gansu [J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2001, 38 (7): 42–43. [王忠, 马启龙, 乔正强, 等. 甘肃虫草寄主昆虫蝠蛾的全人工饲养技术 [J]. 甘肃农业科技, 2001, 38 (7): 42–43]
- Wang Z, Ma QL, Qiao ZQ. Study on the isolation culture of *Cordyceps sinensis* (Berkeley) Saccardo in Gansu Province [J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2001, 7 (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 (7): 43–44]
- Xia F, Chen X, Guo MY, et al. High-throughput sequencing-based analysis of endogenetic fungal communities inhabiting the Chinese *Cordyceps* reveals unexpectedly high fungal diversity [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33437.
- Xu HF. Ecological investigation of *Cordyceps sinensis* in Zaduo of Qinghai Province [J]. *Prataculture & Animal Husbandry*, 2007, 2: 30–34. [徐海峰. 青海杂多县冬虫夏草的生态调查 [J]. 草业与畜牧, 2007, 2: 30–34]
- Yang DR, Yang YX, Shen FR. Research on how *Cordyceps sinensis* fungal infected *Hepialus* larvae [J]. *Chinese Research and Application of Worm Fungus*, 1986, 1: 230–234. [杨大荣, 杨跃雄, 沈发荣. 冬虫夏草真菌感染蝠蛾属幼虫的研究 [J]. 中国虫生真菌的研究与应用, 1986, 1: 230–234]
- Yang TT. Study on the Culture Technique Effective Components of *Cordyceps sinensis* [D]. Jinan: Shandong Polytechnic University, 2012. [杨婷婷. 冬虫夏草人工培养条件及有效活性成分研究 [D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012]
- Yang XR, Liu RX, Guo ZB, et al. Cultivation of *Cordyceps militaris* liquid strains and cultivation experiments with different carbon and nitrogen sources [J]. *Edible Fungus*, 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]
- Yin DH, Chen SJ, Mai KS. Thinking of *Cordyceps* resources protection, regeneration and sustainable utilization [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, 36 (6): 814–816. [尹定华, 陈仕江, 马开森. 冬虫夏草资源保护、再生及持续利用的思考 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (6): 814–816]
- Zhang H, Li Y, Mi J, et al. GC-MS profiling of volatile components in different fermentation products of *Cordyceps sinensis* mycelia [J]. *Molecules*, 2017, 22 (10): 1800.
- Zhang J. A Study on the Identification and Conditions and Mechanism of A Wild *Agaricus bisporus* Mushroom [D]. Taiyuan: Shanxi University, 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]. 太原: 山西大学, 2016]
- Zhang S, Zhang YJ, Srestha B, et al. *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*: Research advances, issues and perspectives [J]. *Mycosystema*, 2013, 32 (4): 577–597. [张姝, 张永杰, Shrestha B, 等. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望 [J]. 菌物学报, 2013, 32 (4): 577–597]
- Zhang YJ, Li E, Wang CS, et al. *Ophiocordyceps sinensis*, the flagship fungus of China: Terminology, life strategy and ecology [J]. *Mycology*, 2012, 3 (1): 2–10.
- Zhao J, Xie J, Wang LY, et al. Advanced development in chemical analysis of *Cordyceps* [J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2014, 87: 271–289.
- Zhao XF. Study on the utilization of different carbon and nitrogen sources by *Pleurotus nebrodensis* mycelium [J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2005, 5: 54–55. [赵秀芳. 白灵菇菌丝对不同碳氮源利用的研究 [J]. 中国土壤与肥料, 2005, 5: 54–55]