六株冬虫夏草相关菌对蝙蝠蛾幼虫侵染特性的研究*

谢 放** 陈照禾 朱玉兰 苏强军 陈 晨 张 育

（兰州交通大学生物与制药工程学院，兰州 730070）

摘 要 【**目的**】本文将冬虫夏草相关菌定义为分离自野生冬虫夏草 *Cordyceps sinensis*，可以反接侵染蝙蝠蛾 *Hepialus armoricanus* 幼虫致死及与冬虫夏草菌 *Ophicordyceps sinensis* 对峙有相互影响的菌株。本文旨在对分离自冬虫夏草不同部位的 6 株相关菌单独或与冬虫夏草菌协同侵染蝙蝠蛾幼虫的效应进行研究。【**方法**】对 6 株相关菌进行生物学特征描述，并通过 ITS 序列比对进行种属鉴定；对 6 株相关菌做了与冬虫夏草菌的对峙实验及单独侵染蝙蝠蛾幼虫的实验；对其中的 2 株菌做了与冬虫夏草菌复合侵染蝙蝠蛾幼虫实验。【**结果**】证明了 6 株相关菌能够影响冬虫夏草菌的生长，其中菌株 2F-2、FD、TB-1 和 TB-4 对冬虫夏草菌抑制率接近 100%，菌株 3-5-2 对冬虫夏草菌抑制率为 4.32%；菌株 MR-1 对冬虫夏草菌抑制率为 77.27%；6 株相关菌均有侵染蝙蝠蛾幼虫的能力：菌株 3-5-2 对蝙蝠蛾幼虫侵染率为 50.0%，菌株 2F-2 对蝙蝠蛾幼虫侵染率为 85.0%，菌株 MR-1 对蝙蝠蛾幼虫侵染率为 73.3%，菌株 FD 对蝙蝠蛾幼虫侵染率为 70.0%，菌株 TB-1 对蝙蝠蛾幼虫侵染率为 64.0%，菌株 TB-4 为 65.0%；相对于单独侵染，复合侵染致死率有所下降。【**结论**】供试的 6 株相关菌均有侵染力并与冬虫夏草菌相互影响。

关键词 冬虫夏草相关菌；蝙蝠蛾幼虫；冬虫夏草菌；侵染

Relative infectiveness of six *Cordyceps sinensis*-related fungal strains to *Hepialus armoricanus* larvae

XIE Fang** CHEN Zhao-He ZHU Yu-Lan SU Qiang-Jun CHEN Chen ZHANG Yu

(School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

Abstract **[Objectives]** To study the relative infectiousness of six fungal strains isolated from different parts of *Cordyceps sinensis* to *Hepialus armoricanus* larvae. *C. sinensis*-related fungi are defined as fungi isolated from wild *C. sinensis* that can infect and kill *H. armoricanus* larvae and interact with *O. sinensis*. **[Methods]** Biological characteristics of 6 strains of related fungi were described and their ITS sequences were aligned to identify the species. The infectiveness of the six strains of related fungi to *H. armoricanus* larvae were tested separately. Two related fungi were tested in a joint infection experiment with *O. sinensis*. **[Results]** The 6 strains of related fungi all affected the growth of *O. sinensis*: The inhibition rate of the 2F-2, FD, TB-1 and TB-4 strains to *O. sinensis* was close to 100%, that of the 3-5-2 strain was 4.32% and that of the MR-1 strain was 77.27%. All six strains had the ability to infect *H. armoricanus* larvae. The infection rate of the 3-5-2 strain was 50.0%, that of the 2F-2 strain was 85.0% and that of the MR-1 strain was 73.3%. The infection rate of FD strain was 70.0%; the infection rate of the TB-1 strain was 64.0% and the infection rate of the TB-4 strain was 65.0%. The mortality rate of joint infections was lower than that of single-strain infections. **[Conclusion]** The 6 strains of related fungi were all infectious to *H. armoricanus* larvae and can interact with *O. sinensis*.

Key words *Cordyceps sinensis*-related fungus; *Hepialus armoricanus* larvae; *Ophiocordyceps sinensis*; infection

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（31560003）

**通讯作者 Corresponding author，E-mail：xfrankf@163.com

收稿日期 Received：2021-04-21；接受日期 Accepted：2021-10-18

冬虫夏草是一种分布于青藏高原及其周边海拔 3 000-5 000 m 的高寒草甸地区，具有极高的药用价值中草药（郭英兰等，2010），其本质是冬虫夏草菌 *Ophicordyceps sinensis* 侵染蝙蝠蛾 *Hepialus armoricanus* 幼虫后，发育形成的真菌长棒状子座与幼虫僵化尸体的菌虫复合体。通过多途径多批次的组织分离和少量子囊孢子分离实验，表明 90%以上的培养物为同一菌种即冬虫夏草菌（刘锡琎等，1989；赵锦等，1989；刘作易等，2003）。

迄今为止在纯培养条件下实现科赫法则严格证明的研究还未见报道。现有报道人工栽培都需要在土壤中出草（李文佳，2012；刘杰等，2016）。另有研究表明，以新鲜野生冬虫夏草为材料存在其它真菌（朱佳石等，2007；张永杰等，2010；Xia *et al.*，2015，2016；谢放等，2016；张四维等，2018）。李玉玲等（2016）的研究表明，在接种时添加蝙蝠蛾幼虫肠道真菌混合菌种（CH1 和 CH2）可以提高侵染率和缩短僵化时间。由此可见，有关冬虫夏草的研究中尚存在疑问。完成冬虫夏草菌生命周期是否必须有伴生菌存在？这些伴生菌的生物学特性如何？伴生菌对冬虫夏草从侵染、僵化、出草、子囊发育各个环节是否有决定性作用？这都是需要深入研究的问题。

环境中伴生菌的数量巨大，仅某些种类可能与冬虫夏草有关系。本文将与冬虫夏草相关菌定义为分离自野生冬虫夏草，它是可以反接侵染蝙蝠蛾幼虫及与冬虫夏草菌对峙有相互影响的菌株。本研究中以新鲜野生冬虫夏草为材料，通过组织分离冬虫夏草菌，并对其它菌株进行了分离纯化。经初步研究筛选，最终有 6 株确定为冬虫夏草相关菌。本实验旨在对 6 种相关菌的生物学特性进行研究，及检验对寄主昆虫蝙蝠蛾幼虫的侵染能力，并探究与冬虫夏草菌相互作用的影响。为解答上述冬虫夏草研究中存在的问题做一些有益的探索。

1　材料与方法

1.1　菌种

供试冬虫夏草菌 GZC（Fungal name registration numbe: FN570054），由兰州交通大学生物与制药工程学院生物种苗工程研究所提供。其它相关菌株的来源信息如表 1 所示。

菌种保存：将获得的菌种接种在牛奶斜面培养基上，待菌充分生长后，棉塞部分用油纸包扎好，移至 2-8 ℃的冰箱中保藏。每半年转接一次。

供试蝙蝠蛾幼虫采挖自甘肃省武威市天祝县抓喜秀龙乡代乾牧场的草原。带回室内，饲养一个月后，挑选活力较强，大小一致的幼虫进行实验。

表 1　菌株来源

Table 1　Sources of strains

菌株编号 Strain number	分离方式 Separation method	GenBank 登录号 GenBank accession number	菌株来源 Strain source
3-5-2	组织分离 Organizational separation	KP284432.1	2015 年合作冬虫夏草虫体
2F-1	组织分离 Organizational separation	KP284433.1	2015 年合作冬虫夏草虫体
MR-1	组织分离 Organizational separation	MK616520.1	2018 年合作冬虫夏草子实体
TB-1	组织分离 Organizational separation	MK616541.1	2017 年天祝冬虫夏草子实体
FD	孢子分离 Spore separation	MK568061.1	2018 年天祝冬虫夏草子实体
TB-4	孢子分离 Spore separation	MK616757.1	2018 年天祝冬虫夏草子实体

1.2　培养基

PDA 培养基：马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 15 g，蒸馏水 1 000 mL，调节 pH 为 6.5。

牛奶培养基：牛奶 200 mL，马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，水解乳蛋白 5 g，酵母粉 1 g，硫酸

镁 0.2 g，磷酸二氢钾 1 g，复合维生素 B 1 片，琼脂 15 g，蒸馏水 1 000 mL，调节 pH 为 6.5。

1.3 形态学观察及鉴定

观察记录菌落的宏观特征，并用数码相机拍照，用 MOTICB 显微镜观察菌丝、产孢结构、孢子形态等微观结构，并用数码相机拍照。

1.4 对峙培养实验

配制牛奶培养基，灭菌后均匀倒在 90 mm 的培养皿中，待培养基凝固后在超净工作台中放置 2 d，除去污染的培养基。选择生长良好、菌落较大的相关菌与冬虫夏草菌菌落，用已灭菌的 9 mm 的打孔器沿菌落边缘打孔，并将打好的大小一致的 2 种菌块接种于培养皿中，且两菌块相距 3 cm，用封口膜封口处理，每个菌株设置 3 个重复，每隔 5 d 记录菌落直径并拍照记录，共记录 50 d。

抑菌率 = [(对照菌落半径-处理菌落半径)/对照菌落半径] × 100%。

拮抗系数分级标准（宋漳和陈辉，2002）：Ⅰ级：相关菌占据平皿 100%；Ⅱ级：相关菌占据平皿≥3/4；Ⅲ级：2/3≥相关菌占据平皿<3/4；Ⅳ级：1/3≥相关菌占据平皿 ＜2/3；Ⅴ级：相关菌占据平皿 ＜1/3；Ⅵ级：中国被毛孢占据平皿 100%。

1.5 回接侵染实验

由于本实验所选的寄主蝙蝠蛾幼虫来自野外采挖，为消除虫龄差别及虫体自生携带的杂菌对侵染结果的影响，供试幼虫均在实验条件下培养 30 d 后，选择虫体大小一致的幼虫进行侵染实验。

1.5.1 相关菌菌株分生孢子悬液制取 加入 5 mL 无菌水于菌落平板内，用灭菌过的毛笔轻轻刷洗菌落表面，将分生孢子从菌落表面洗下，再用无菌水润洗过的 4 层纱布将菌丝、培养基等杂质过滤掉，最后定容至 10 mL，镜检分生孢子。3-5-2 菌株分生孢子悬液浓度为（0.742 ± 0.035）× 10^7 个/mL，2F-2 菌株分生孢子悬液浓度为（0.531 ± 0.087）× 10^8 个/mL，TB-1 菌株分生孢子悬液浓度为（0.572±0.083）× 10^9 个/mL，TB-4（0.537± 0.076）× 10^9 个/mL，冬虫夏草菌菌株分生孢子悬液浓度为（0.625±0.047）× 10^8 个/mL。

1.5.2 相关菌菌株菌丝悬液制备 无分生孢子相关菌用直径 9 mm 打孔器在相关菌菌落打孔，取 5 mL 无菌水与取下的菌丝混合，用研磨器研碎得到菌丝悬液，最后定容至 10 mL。

1.5.3 相关菌菌株单独侵染蝙蝠蛾幼虫 用涂有相关菌菌株分生孢子或菌丝悬液的新鲜胡萝卜片喂养蝙蝠蛾幼虫，每隔 5 d 换食 1 次，每天观察 1 次，并拍照记录幼虫感染情况。

1.5.4 相关菌菌株与冬虫夏草菌复合侵染蝙蝠蛾幼虫 将相关菌菌株与冬虫夏草菌分生孢子悬浮液按照 1∶1 比例混合，涂于胡萝卜片表面，每隔 5 d 换食 1 次，每天观察 1 次，并拍照记录幼虫感染情况。

1.6 DNA 提取、ITS 片段扩增及测序

DNA 提取：刮取 PDA 培养基上的新鲜菌丝，用 OMEGA D3195-01 试剂盒提取总 DNA。

ITS 片段扩增：

本实验采用的扩增引物购买自上海生工生物公司，为真菌通用引物 ITS1 和 ITS4，以上述相关菌基因组 DNA 为模板。PCR 反应程序：① 95 ℃，3 min；② 95 ℃，30 s；56 ℃，30 s；72 ℃，1 min，共 35 个循环；③ 72 ℃，10 min；4 ℃。反应体系是 25 μL：上引物 ITS1 0.5 μL，模板 1 μL，下引物 ITS4 0.5 μL，Mix12.5 μL，ddH_2O 10.5 μL。经 PCR 扩增其 ITSrDNA 片段进行测序。

PCR 产物纯化和测序：由上海美吉生物科技有限公司完成。

1.7 数据处理

NJ 系统发育树采用 MEGA-X 绘制。

2 结果与分析

2.1 相关菌菌落、菌丝及分生孢子的形态学描述

各相关菌菌落形态、菌丝形态及分生孢子形态如图 1 所示。

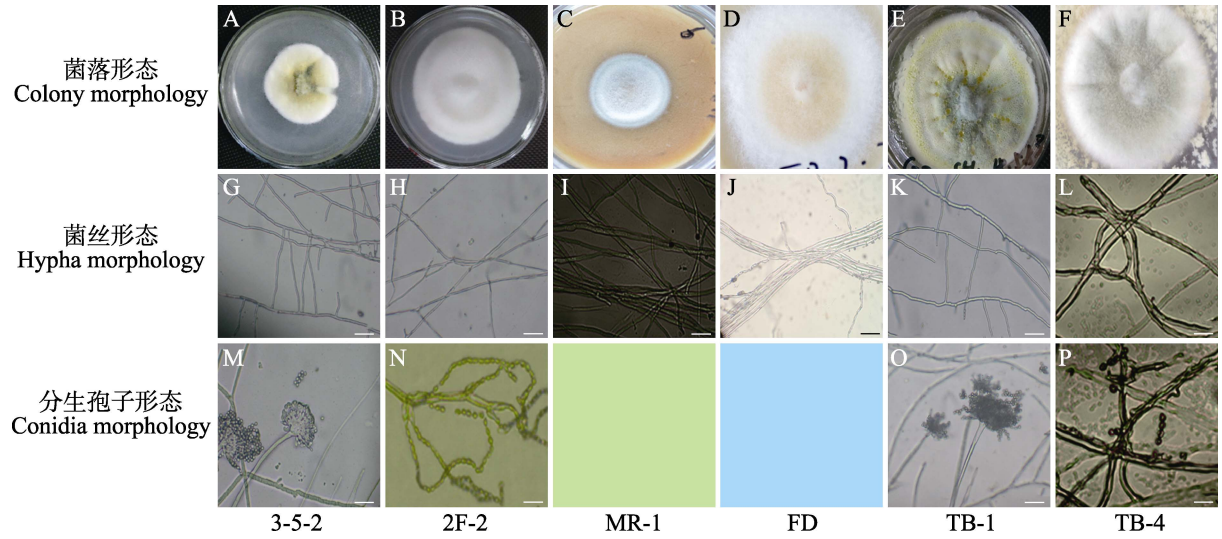

图 1　不同相关菌的菌落、菌丝及分生孢子形态（标尺=10 μm）

Fig. 1　Morphology of colony, hyphae and conidia of different related fungi (Bars=10 μm)

A. 3-5-2 菌株菌落形态；B. 2F-2 菌株菌落形态；C. MR-1 菌株菌落形态；D. FD 菌株菌落形态；E. TB-1 菌株菌落形态；F. TB-4 菌株菌落形态；G. 3-5-2 菌株菌丝形态；H. 2F-2 菌株菌丝形态；I. MR-1 菌株菌丝形态；J. FD 菌株菌丝形态；K. TB-1 菌株菌丝形态；L. TB-4 菌株菌丝形态；M. 3-5-2 菌株分生孢子形态；N. 2F-2 菌株分生孢子形态；O. TB-1 菌株分生孢子形态；P. TB-4 菌株分生孢子形态。

A. Colony morphology of strain 3-5-2; B. Colony morphology of strain 2F-2; C. Colony morphology of strain MR-1; D. Colony morphology of strain FD; E. Colony morphology of strain TB-1 strain; F. Colony morphology of strain TB-4; G. Hypha morphology of strain 3-5-2; H. Hypha morphology of strain 2F-2; I. Hypha morphology of strain MR-1; J. Hypha morphology of strain FD; K. Hypha morphology of strain TB-1; L. Hypha morphology of strain TB-4; M. Conidia morphology of strain 3-5-2; N. Conidia morphology of strain 2F-2; O. Conidia morphology of strain TB-1; P. Conidia morphology of strain TB-4.

3-2-1：在 PDA 培养基上，该菌株生长较缓慢，菌落呈白色，边缘较为整齐，质地坚硬，生长后期会出现黄绿色孢子，表面产生暗黄色液滴。显微镜下观察，菌丝呈透明状且粗细均匀，表面光滑无疣，有隔。产孢结构顶端膨大，其上着生较多瓶状小梗，孢子较小为圆形，数量较少。

2F-2：在 PDA 培养基上该菌株表现生长较为迅速，呈白色絮状，气生菌丝较发达，边缘较为整齐，菌落可分泌黄色色素。显微镜下，菌丝光滑，呈透明状且粗细均匀，有隔，无明显锁状联合现象。产孢结构呈瓶颈状，能产生大量椭圆形链状孢子。

MR-1：该菌株在牛奶培养基上生长较慢，气生菌丝较短且疏松，分布均匀，菌落质地柔软，最外层菌丝较短且为白色，内层则呈现墨绿色。在显微镜下，菌丝透明，网格状交错，无扭结现象，没有发现明显孢子及产孢结构。

FD：该菌株在牛奶培养基上生长较快，菌落中心区域菌丝较为稀疏，边缘区域菌丝致密，产米黄色色素，菌落中间形成一个黄圈，边缘区域为白色，气生菌丝较长。显微镜下，数根较细菌丝交联扭结，形成一根粗菌丝，粗菌丝表面微疣，无明显孢子和相应的产孢结构。

TB-1：该菌株在牛奶培养基上生长较为缓慢，菌落边缘整齐，白黄相间，产亮黄色色素，气生菌丝不发达，有黄色小液滴附着，表面生长有绿色粉状孢子，褶皱明显。显微镜下，菌丝光滑透明且粗细均匀，无扭结。有较长孢子梗，产孢结构顶端膨大，孢子呈圆形，簇状分布。

TB-4：该菌株牛奶培养基上生长较为迅速，菌落边缘为白色，质地疏松，呈绒毛絮状，有明显褶皱，气生菌丝较长，中心有浓密的灰绿色孢子。显微镜下，菌丝呈透明状，有隔且隔间距不规则，有数根菌丝缠绕成圆球状的结构。产孢结构单生或对生，每个孢子梗上有 4 到 5 串呈串珠状排列的孢子，每串约有 10 个。

表 2 不同相关菌菌落直径、菌丝直径及分生孢子大小

Table 2 Colony diameter, hypha diameter and conidia size of different related bacteria

菌株编号 Strain number	菌落直径（cm） Colony diameter (μm)	菌丝直径（μm） Hyphae diameter (μm)	分生孢子大小（μm） Conidia size (μm)
3-5-2	3.25	2.5-3.0	2.5-4.0
2F-2	6.88	1.5-2.0	(1.5-1.7)×(2.3-2.5)
MR-1	3.92	2.5-3.0	—
FD	6.76	2.5-3.0	—
TB-1	4.9	2.0-3.0	2.0-3.0
TB-4	7.28	3.0-4.5	2.5-4.0

—表示未见明显产孢结构。

— indicates that no obvious sporulation structure is seen.

2.2 相关菌系统发育树分析

经 ITS 序列构建的系统发育树比对结果（图 2）表明，6 个菌株中 3-5-2 为曲霉属 *Aspergillus* 的杂色曲霉 *Aspergillus versicolor*，2F-2 为虫草科 *Cordycipitaceae* 棒束孢属 *Isaria* 的玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea*，MR-1 为粪壳菌纲 *Sordariomycetes* 真菌，FD 为镰刀菌属 *Fusarium* Link 真菌，TB-1 为青霉属 *Penicillium* 的产黄青霉 *Penicillium chrysogenum*，TB-4 为枝孢霉属 *Cladosporium* 的真菌。

2.3 相关菌与冬虫夏草菌对峙实验结果

由图 3 可以看出各菌株生长速率远大于冬

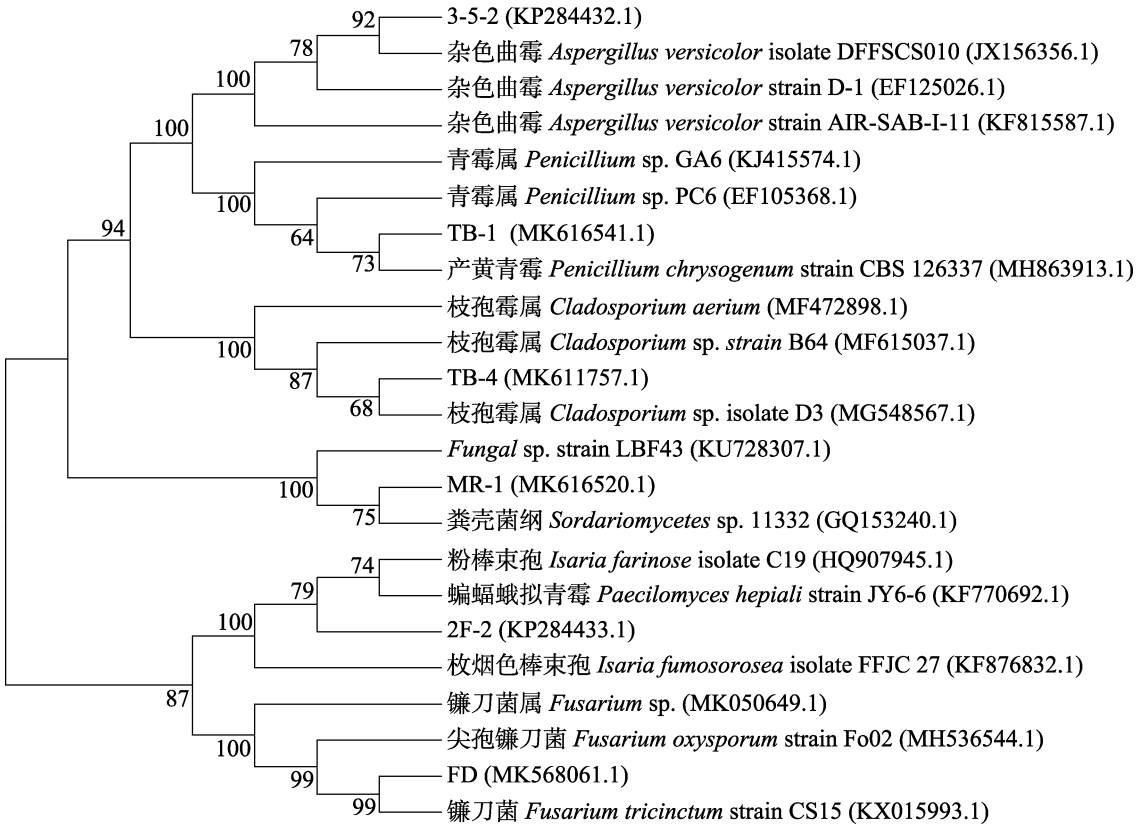

图 2 基于 ITS 序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree constructed based on ITS sequence

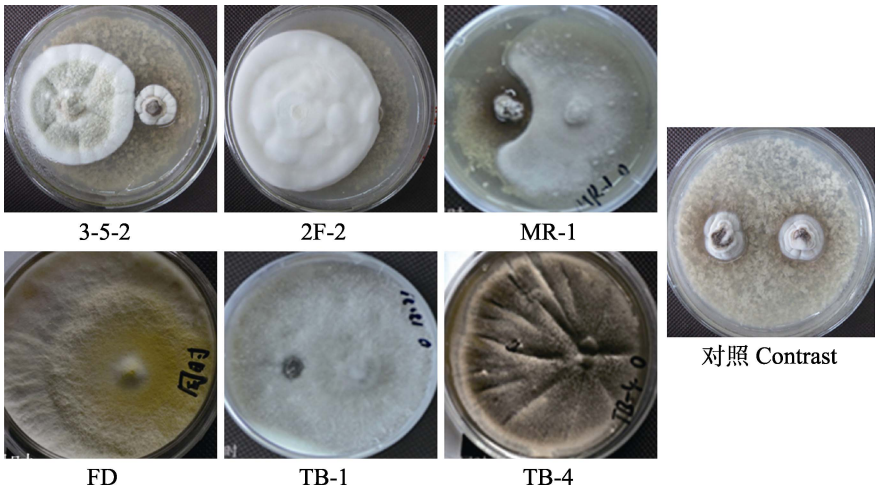

图 3　各菌株与中国被毛孢同时接种对峙培养 40 d 后的菌落形态

Fig. 3　Colony morphology of each strain after 40 days of confrontation culture with *Ophiocordyceps sinensis*

3-5-2：3-5-2 菌株与冬虫夏草菌同时接种对峙培养 40 d 后的菌落形态；2F-2：2F-2 菌株与冬虫夏草菌同时接种对峙培养 40 d 后的菌落形态；MR-1：MR-1 菌株与冬虫夏草菌同时接种对峙培养 40 d 后的菌落形态；FD：FD 菌株与冬虫夏草菌同时接种对峙培养 40 d 后的菌落形态；TB-1：TB-1 菌株与冬虫夏草菌同时接种对峙培养 40 d 后的菌落形态；TB-4：TB-4 菌株与冬虫夏草菌同时接种对峙培养 40 d 后的菌落形态。下图同。

3-5-2: The colony morphology of the 3-5-2 strain and *Ophiocordyceps sinensis* inoculated at the same time after 40 days of confrontation culture; 2F-2: The colony morphology of the 2F-2 strain and *O. sinensis* inoculated at the same time after 40 days of confrontation culture; MR-1: The colony morphology of the MR-1 strain and *O. sinensis* inoculated at the same time after 40 days of confrontation culture; FD: The colony morphology of the FD strain and *O. sinensis* inoculated at the same time after 40 days of confrontation culture; TB-1: The colony morphology of the TB-1 strain and *O. sinensis* inoculated at the same time after 40 days of confrontation culture; TB-4: The colony morphology of the TB-4 strain and *O. sinensis* inoculated at the same time after 40 days of confrontation culture. The same below.

虫夏草菌，且对冬虫夏草菌的生长有不同程度的影响。其中 2F-2、FD、TB-1 和 TB-4，由于其生长迅速，快速消耗培养基养料占领生存空间，冬虫夏草菌还未明显生长便被其包围，限制了冬虫夏草菌的生长空间及营养消耗，使得冬虫夏草菌生长及其缓慢，培养至 40 d 时，基本看不到冬虫夏草菌菌落形态，因此，抑制率接近 100%，拮抗系数评定为Ⅰ级。菌株 3-5-2 对冬虫夏草菌的抑制作用较弱，在平板对峙培养 40 d 时，实验组冬虫夏草菌的菌落直径达到 1.55 cm，对照组为 1.62 cm，因此抑制率为 4.32%，拮抗系数评定为Ⅳ级。菌株 MR-1 虽生长速度高于冬虫夏草菌，但可以从对峙结果看出，冬虫夏草菌可以产生抑制 MR-1 生长的物质，从而形成了拮抗带，反过来也减弱了 MR-1 对冬虫夏草菌的抑制作用，经过 40 d 的对峙培养后，实验组冬虫夏草菌的菌落直径为 0.56 cm，对照组为 1.62 cm，因此抑制率为 77.27%，拮抗系数评定为Ⅲ级。

2.4　相关菌对蝙蝠蛾幼虫的侵染结果

由图 4 可以看出，不同菌株单独侵染蝙蝠蛾幼虫后，致死的蝙蝠蛾幼虫形态差异很大，僵虫颜色以及后期菌丝覆盖密度均有明显差异，表 3 结果显示不同菌株侵染的致死时间及侵染率差异更为明显。3-5-2 菌株致死后的虫体表皮颜色呈土褐色，死亡 30 d 后菌丝也未曾覆盖整个虫体，其致死时间约为 13 d，侵染率最低，约为 50%。2F-2 菌株致死后的虫体表皮颜色呈米黄色，相较其他菌株偏白，死亡 15 d 后菌丝基本布满虫体，死亡 30 d 后已将虫体完全包裹，其致死时间最短，约为 2 d，侵染率最高，约为 85%。MR-1 菌株致死的虫体表皮呈黄褐色，死亡 3 d 后便能明显看见菌丝从虫体四周伸出，15 d 时已将虫体完全包裹，其致死时间为约 11 d，侵染率约为 73.3%。FD 菌株致死后的虫体表皮也呈土黄色，虫体较其它菌株更为干皱，死亡 3 d 后菌

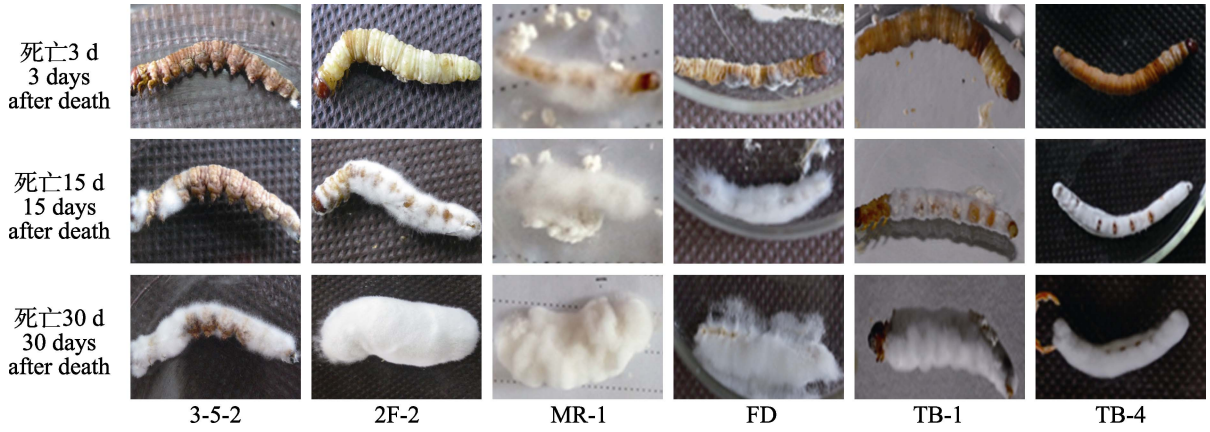

图 4　蝙蝠蛾幼虫被各相关菌感染后的形态

Fig. 4　Morphology of the *Hepialus armoricanus* larvae infected by various related fungi

表 3　蝙蝠蛾幼虫感染情况统计

Table 3　Statistics of infection of the *Hepialus armoricanus* larvae

菌株编号 Strain number	致死时间（d） Time to death (d)	供试幼虫数量（头） Number of larvae tested (pieces)	侵染率（%） Infection rate (%)
3-5-2	13	30	50.0
2F-2	2	30	85.0
MR-1	11	30	73.3
FD	14	30	70.0
TB-1	7	30	64.0
TB-4	14	30	65.0

丝开始长出表皮，15 d 时已将虫体完全包裹，其致死时间为 14 d，侵染率约为 70%。TB-1 及 TB-4 菌株致死后的虫体表皮颜色呈金黄色，死亡 15 d 时菌丝开始布满虫体，至 30 d 时菌丝完全包裹虫体，致死时间分别约为 7 d 和 14 d，侵染率分别约为 64%和 65%。

2.5　菌株 3-5-2、2F-2 与冬虫夏草菌复合侵染蝙蝠蛾幼虫结果

经菌株 3-5-2 与冬虫夏草菌以 1∶1 的比例混合侵染蝙蝠蛾幼虫后，致死虫体表皮颜色随侵染时间的增加逐渐加深变黑，且后期虫体会出现腐烂现象（图 5），这与单独侵染差异明显。菌丝着生部位仅在头部附近，其余躯体部位一直未见菌丝着生，这与单独侵染基本吻合。复合侵染后致死时间与单独侵染相差不多，但侵染率会明显降低，从 50%降至 10%（表 4）。

经菌株 2F-2 与冬虫夏草菌以 1∶1 的比例混合侵染蝙蝠蛾幼虫，由图 6 可以看出，致死虫体

图 5　菌株 3-5-2 与冬虫夏草菌复合侵染蝙蝠蛾幼虫后死亡幼虫形态

Fig. 5　Morphology of the dead larvae after the joint infection of strain 3-5-2 and *Ophiocordyceps sinensis*

图 6　菌株 2F-2 与中国被毛孢复合侵染蝙蝠蛾幼虫后死亡幼虫形态

Fig. 6　Morphology of the dead larvae after the joint infection of strain 2F-2 and *Ophiocordyceps sinensis*

表 4　复合侵染与单独侵染的结果比对

Table 4　Comparison of results between joint infection and single infection

菌株编号 Strain number	单独侵染 Infestation alone		复合侵染 Compound infection	
	致死时间（d） Time to death (d)	侵染（%） Infection rate (%)	致死时间（d） Time to death (d)	侵染率（%） Infection rate (%)
3-5-2	13	50	12	10
2F-2	2	85	9	20

表皮颜色偏金黄色，且在第 3 天就能看见菌丝已蔓延至整个躯体，第 5 天就能附满整个躯体，生长至 40 d 左右时会有絮状菌丝长出，这些现象均与单独侵染时有明显差异；从表 4 数据可以看出，复合侵染的致死时间变长，从 2 d 变至 9 d，侵染率也明显降低，从 85%降至 20%。

3　讨论

目前冬虫夏草菌的人工培育中寄主昆虫的饲养是在土壤或类似土壤的基质中，接种后也是定植到土壤中（李文佳，2012；Cao *et al.*，2015），因此，现有技术无法排除共生菌在冬虫夏草生命周期中的影响。分子生物学证据表明野生冬虫夏草子座和虫体组织中存在其它真菌，但均未见分离纯化培养（朱佳石等，2007；张永杰等，2010；Xia *et al.*，2015，2016；谢放等，2016；张四维等，2018），现有人工培养都要在土中养虫或定植僵虫到土壤中，暗示着无法排除伴生菌存在和参与。加之没有严格按科赫法则在纯培养条件下验证的相关报道。因此冬虫夏草相关菌的研究还是有一定的必要性。

野外采集蝙蝠蛾幼虫比较困难，且死亡率高，这就对冬虫夏草菌是否能单独侵染蝙蝠蛾幼虫，以及顺利发育出子座，完成子囊孢子弹射等有关研究造成很大限制，也使得本研究做的工作比较粗放，且在不同年份进行。对寄主昆虫侵染试验验证了单独接种具有侵染性，这也说明供试的 6 种菌株符合冬虫夏草相关菌标准。本研究对 2 个菌株进行混合侵染试验，结果表明联合侵染并不能提高侵染率和缩短死亡时间。这一结果与前人（李玉玲等，2016）研究的结论不一致，造

成这种差别的原因是多方面的。首先，在菌种方面，本研究采用的是杂色曲霉（3-5-2）和玫烟色棒束孢（2F-2），而李玉玲等（2016）使用的是肠道分离的蝙蝠蛾拟青霉（CH1 和 CH2）。其次，在接种材料和接种方法也存在差异。接种材料的生长状态和活力，以及幼虫的生长龄期对侵染均有影响。

本研究存在的主要不足是侵染所用的蝙蝠蛾幼虫是野外采挖所得，并不是纯无菌环境培养，因此，感染致死的幼虫所表现的性状，可能夹杂其它微生物的干扰作用。最理想方法是在无病原物条件下从虫卵消毒开始，无菌卵移入无菌环境，采用无菌饲料、无菌操作饲养获得无菌幼虫作为试验材料。虽然这在理论上可行，但是对于设施条件要求与人员技术而言，成本巨大。目前达到完全无菌条件下养虫这一条件的研究还未见报道。况且此条件下幼虫是否可以正常生长也没有成功的先例。有报道饲喂不同食材对蝙蝠蛾幼虫成活率有显著差异（黄雪峰等，2016）。本研究用 6 种相关菌侵染蝙蝠蛾幼虫后，只是通过肉眼观察以性状重复出现最多的虫体为研究对象，难免存在不够严谨之处。在侵染之后未曾对感染僵虫体上的菌丝进行取样鉴定和分析验证是因为上述条件，从非完全无病原物的幼虫侵染后采样验证仍然无法排除污染因素，故而，本研究所出现的侵染性状也只做参考。今后改进研究要考虑以下几方面：一是获得数量充足且生长均匀的供试寄主昆虫（现在已有人售卖基质或土壤中饲养的幼虫，但均匀情况无保证）；二是接种用菌体材料的培养和接种方法要标准化；三是对于僵虫要取样分离菌种，验证接种和致病僵化的菌种是否一致，混合接种时要考虑检测菌种的占比或侵染顺序问题。

本文所涉及的 6 株菌均来自野生冬虫夏草，并能影响冬虫夏草菌的生长，且能回接侵染蝙蝠蛾幼虫，故此，本文所研究的 6 株菌均为冬虫夏草相关菌。

参考文献 (References)

Cao L, Ye YS, Han RC, 2015. Fruiting body production of the medicinal Chinese caterpillar mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes), in artificial medium. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(11): 1107–1112.

Guo YL, Xiao PG, Wei JC, 2010. On the biology and sustainable utilization of the Chinese medicine treasure *Ophiocordyceps sinensis*. *Modern Chinese Medicine*, 12(11): 3–8. [郭英兰, 肖培根, 魏江春, 2010. 论冬虫夏草生物学与可持续利用. 中国现代中药, 12(11): 3–8.]

Huang XF, Wang Z, Zheng FY, Lin MY, 2016. Effect of 5 foodstuffs on growth of *Hepialus* larvae. *Wuyi Science*, 32 (1): 65–68. [黄雪峰, 王忠, 郑方毅, 林梅燕, 2016. 5 种食料对蝙蝠蛾幼虫生长的影响. 武夷科学, 32 (1): 65–68.]

Li YL, Yao YS, Zhang ZH, Liu X, Xu HF, Ma SL, Wu ZY, Zhu JS, 2016. Synergy of fungal complexes isolated from the intestines of *Hepialus lagii* larvae in increasing infection potency. *Journal of Fungal Research*, 14(2): 96–112. [李玉玲, 姚艺桑, 张宗豪, 刘欣, 徐海峰, 马少丽, 吴子嫩, 朱佳石, 2016. 蝙蝠蛾幼虫肠道真菌复合体中的多菌种与中国被毛孢分生孢子联合侵染蝙蝠蛾幼虫提高侵染效能. 菌物研究, 14(2): 96–112.]

Li WJ, 2012. Industrialization project of artificially cultivating *Cordyceps sinensis* using bionics. Hubei Province, Shancheng Shuidu Cordyceps Co., Ltd., 2012-10-09. [李文佳, 2012. 运用仿生学人工培育冬虫夏草产业化工程. 湖北省, 宜昌山城水都冬虫夏草有限公司, 2012-10-09.]

Liu J, Li YL, Zan K, Zheng J, Guo LN, Ma SC, Jin HY, Qian ZM, Li WJ, 2016. A comparative study on the content of Pb，Cd，As，Hg and Cu between cultivated and natural *Cordyceps sinensis*. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 30(9): 912–918. [刘杰, 李耀磊, 昝珂, 郑健, 过立农, 马双成, 金红宇, 钱正明, 李文佳, 2016. 冬虫夏草人工繁育品和野生冬虫夏草中 5 种重金属及有害元素含量的比较. 中国药事, 30(9): 912–918.]

Liu XJ, Gou YL, Yu YX, Zeng W, 1989. Isolation and identification of the anamorphic state of *Cordyceps sinensis*. *Acta Mycologica Sinica*, 8(1): 352–400. [刘锡琎, 郭英兰, 俞永信, 曾纬, 1989. 冬虫夏草无性阶段的分离和鉴定. 真菌学报, 8(1): 352–400.]

Liu ZY, Liang ZQ, Liu AY, 2003. Investigation on microcycle conidiation of ascospores and conidiogenous structures of anamorph of *Cordyceps sinensis*. *Guizhou Agricultural Sciences*, 31(1): 3–5. [刘作易, 梁宗琦, 刘爱英, 2003. 冬虫夏草子囊孢子萌发及其无性型观察. 贵州农业科学, 31(1): 3–5.]

Song Z, Chen H, 2002. In vitro antagonism of *Trichoderma viride* on soil-borne pathogenic fungi. *Journal of Fujian College of Forestry*, 22(3): 219–222. [宋漳, 陈辉, 2002. 绿色木霉对土传病原真菌的体外拮抗作用. 福建林学院学报, 22(3): 219–222.]

Xia F, Liu Y, Guo MY, Shen GR, Juan L, Zhou XW, 2016.

Pyrosequencing analysis revealed complex endogenetic microorganism community from natural Dong Chong Xia Cao and its microhabitat. *BMC Microbiology*, 16(1): 196–208.

Xia F, Liu Y, Shen GR, Lian XG, Zhou XW, 2015. Investigation and analysis of microbiological communities in natural *Ophiocordyceps sinensis*. *Can. J. Microbiol.*, 61: 104–111.

Xie F, Zhang Y, Zhu YL, 2016. Biological characteristics of a strain of *Ophicordyceps sinensis* related fungi biological characteristics of *Chinese caterpillar fungus*-related fungi. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 28(2): 306–311. [谢放, 张育, 朱玉兰, 2016. 一株冬虫夏草相关菌株的生物学特性. 浙江农业学报, 28(2): 306–311.]

Zhang SW, Cen K, Liu Y, Zhou XW, Wang SC, 2018. Metatranscriptomics analysis of the fruiting caterpillar fungus collected from the Qinghai-Tibetan plateau. *Science in China: Life Sciences*, 48(5): 562–570. [张四维, 岑凯, 刘艳, 周选围, 王成树, 2018. 青藏高原野生冬虫夏草子实体发育时期的宏转录组研究. 中国科学:生命科学, 48(5): 562–570.]

Zhang YJ, Zhang S, Liu XZ, Wen HA, 2010. Current understanding toward population genetics and biology of the Chinese caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis*. Abstracts of the 2010 Annual Conference of the Chinese Society of Mycology. Zhangjiajie. 2. [张永杰, 张姝, 刘杏忠, 文华安, 2010. 冬虫夏草菌的种群遗传学与生物学研究. 2010 年中国菌物学会学术年会论文摘要集. 张家界. 2.]

Zhao J, Wang N, Chen YQ, Li TH, Qu LH, 1989. Molecular identification for the asexual stage of *Cordyceps sinensis*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sun Yatseni*, 38(1): 121–123. [赵锦, 王宁, 陈月琴, 屈良鹊, 1989. 冬虫夏草无性型的分子鉴别. 中山大学学报(自然科学版), 38(1): 121–123.]

Zhu JS, Guo YL, Yao YS, Zhou YJ, Lu JH, Qi Y, Chen W, Liu XJ, Wu Z, Zhang L, Yin WY, Zheng TY, Zhang LJ, 2007. Coexistence of *Hirsutella sinensis* and *Paecilomyces hepialid* DNA during maturation of *Cordyceps sinensis* and changes in fungal competitive proliferation capability and chemical profiles. *Journal of Fungal Research*, 5(4): 214–224. [朱佳石, 郭英兰, 姚艺桑, 周妍娇, 陆继红, 齐莹, 谌巍, 刘星阶, 吴子, 张丽, 殷蔚黄, 郑陶冶, 张丽娟, 2007. 冬虫夏草成熟过程中中国被毛孢和蝙蝠蛾拟青霉DNA共存及竞争增殖力、化学成分变化. 菌物研究, 5(4): 214–224.]