

# 云南嵩明大哨天然虫生真菌及其内生真菌的分离鉴定与抑菌活性分析

许小蓉<sup>1</sup>, 黄之镨<sup>1</sup>, 虞泓<sup>2</sup>, 许玉潇<sup>1</sup>, 张冰<sup>1</sup>, 张科涛<sup>1</sup>, 刘朝金<sup>1</sup>, 赵庆<sup>1</sup>, 张晓梅<sup>\*1,2</sup>

1 云南中医药大学基础医学院中药学院, 云南 昆明 650500

2 云南大学生态与环境学院云百草实验室, 云南 昆明 650091

许小蓉, 黄之镨, 虞泓, 许玉潇, 张冰, 张科涛, 刘朝金, 赵庆, 张晓梅. 云南嵩明大哨天然虫生真菌及其内生真菌的分离鉴定与抑菌活性分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4048-4065

Xu Xiaorong, Huang Zhipu, Yu Hong, Xu Yuxiao, Zhang Bing, Zhang Ketao, Liu Chaojin, Zhao Qing, Zhang Xiaomei. Isolation, identification, and antimicrobial activities of natural entomogenous fungi and the endophytic fungi from Dashao village, Songming county, Yunnan province[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4048-4065

**摘要:**【背景】云南存在着丰富的虫草资源,天然虫草群落中蕴藏多样的真菌资源,是挖掘新型抑菌活性化合物的潜在来源。【目的】了解云南嵩明大哨天然虫生真菌及其内生真菌的物种多样性,并从中筛选具有抑菌活性的菌株。【方法】采用组织分离法对所采集的野生虫草样本进行虫生真菌及其内生真菌的分离,并通过形态观察和 ITS 联合 *nrSSU*、*nrLSU*、*tef-1a*、*rpb1*、*rpb2* 多基因测序进行物种鉴定及多样性分析;通过平板对峙法以 7 株病原细菌、5 株植物病原真菌为病原指示菌进行抑菌活性测试。【结果】共采集 86 份天然虫草样本,经鉴定隶属于 3 科 5 属 7 种,包括虫草科(*Cordycipitaceae*)虫草属(*Cordyceps*) (1 种)、白僵菌属(*Beauveria*) (2 种)、鳞翅虫草属(*Samsoniella*) (2 种)、麦角菌科(*Clavicipitaceae*)泛普可尼亚属(*Metapochonia*) (1 种),以及线虫草科(*Ophiocordycipitaceae*)线虫草属(*Ophiocordyceps*) (1 种)。同时,从采集到的虫草样本中分离得到 26 株内生真菌,分属于 9 科 9 属,其中木霉属(*Trichoderma*) (38%)和镰刀菌属(*Fusarium*) (19%)为此次分离得到的优势菌属。对所分离保存的真菌按其分离源及种类归属,从虫生真菌和内生真菌菌株中共挑取 20 株代表性菌株进行抑菌活性筛选,有 11 株真菌对 2 株及以上病原指示细菌具有不同程度的抑菌活性,13 株真菌对 1 株以上植物病原真菌具有不同程度拮抗能力;其中 *Trichoderma* sp. Y3-1 和 *Fusarium* sp. WZ3-1 具有广谱抑菌活性。【结论】云南嵩明大哨分布有丰富的虫生真菌及内生真菌资源,分离所得的真菌对多种病原菌具有不同程度的抑制作用。本研究丰富了云南虫草资源多样性,为云南省虫草及其内生真菌资源的开发利用提供了数据支持,也为下一步从虫草

基金项目: 国家自然科学基金(31960001); 云南省万人计划“青年拔尖人才”专项

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31960001); Top Young Talents of Ten Thousand Program in Yunnan Province

\*Corresponding author: E-mail: meimeizhang.net@163.com

Received: 2022-02-23; Accepted: 2022-03-26; Published online: 2022-04-21

及其相关真菌资源中挖掘抑菌活性物质提供了菌株资源。

**关键词:** 虫生真菌; 内生真菌; 纯培养分离; 物种多样性; 抑菌活性

## Isolation, identification, and antimicrobial activities analysis of natural entomogenous fungi and the endophytic fungi from Dashao village, Songming county, Yunnan province

XU Xiaorong<sup>1</sup>, HUANG Zhipu<sup>1</sup>, YU Hong<sup>2</sup>, XU Yuxiao<sup>1</sup>, ZHANG Bing<sup>1</sup>, ZHANG Ketao<sup>1</sup>, LIU Chaojin<sup>1</sup>, ZHAO Qing<sup>1</sup>, ZHANG Xiaomei<sup>\*1,2</sup>

1 School of Basic Medicine, School of Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Yunnan Herbal Laboratory, School of Ecology and Environmental Science, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

**Abstract:** [Background] Yunnan boasts abundant *Cordyceps* species resources and the natural *Cordyceps* species community contains diverse endophytic fungi, which can be used for mining antimicrobial. [Objective] To investigate the diversity of entomogenous fungi and the endophytic fungi in Dashao village, Songming county, Yunnan province, and screen strains with antimicrobial activities. [Methods] Entomogenous fungi and the endophytic fungi were isolated from *Cordyceps* species samples with tissue separation method. They were identified and the diversity was analyzed based on morphological observation and sequencing of ITS, *nrSSU*, *nrLSU*, *tef-1a*, *rpb1*, and *rpb2*. The activities against 7 pathogenic bacteria and 5 plant pathogenic fungi were tested by plate confrontation assay. [Results] A total of 86 natural *Cordyceps* species samples were collected, which belonged to 7 species in 5 genera in 3 families: *Cordyceps* (1 species), *Beauveria* (2 species), and *Samsoniella* (2 species) in *Cordycipitaceae*, *Metapochonia* (1 species) in *Clavicipitaceae*, and *Ophiocordyceps* (1 species) in *Ophiocordycipitaceae*. Meanwhile, 26 strains of endophytic fungi in 9 genera of 9 families were isolated from the samples, among which *Trichoderma* (38%) and *Fusarium* (19%) dominated. In addition, 20 strains, which were selected from entomogenous fungi and endophytic fungi according to their origins and taxonomy, were tested for the antimicrobial activities. Results demonstrated that 11 strains showed activities against two or more pathogenic bacteria, and 13 strains against more than one plant pathogenic fungi. *Trichoderma* sp. Y3-1 and *Fusarium* sp. WZ3-1 demonstrated broad-spectrum antimicrobial activities. [Conclusion] The Dashao village in Songming county of Yunnan province enjoys rich resources of entomogenous fungi and endophytic fungi and the isolated fungi show activities against diverse pathogens. This study enriches the diversity of entomogenous fungi in Yunnan province, providing not only data support for the development and utilization of entomogenous fungi and the endophytic fungi in Yunnan province but also strains for mining active substances from them.

**Keywords:** entomogenous fungi; endophytic fungi; culture isolation; species diversity; antimicrobial activities

虫草是寄生于昆虫、少数真菌和植物体上的一类真菌。按照虫草分类系统, 虫草包括了隶属于子囊菌门(*Ascomycota*)粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)肉座菌目(*Hypocreales*)的虫草科(*Cordycipitaceae*)、线虫草科(*Ophiocordycipitaceae*)、麦角菌科(*Clavicipitaceae*)等科及其他分类地位暂未确定的类<sup>[1]</sup>。目前, 从菌物名录数据库(<http://www.mycobank.org>)和 Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>)中可检索到 1 300 余种虫草, 中国约有 400 余种, 而我国报道的有效名称不足 200 个<sup>[2-3]</sup>。虫草的分布、数量与地理位置、土壤、气候和昆虫寄主等环境因素有很大关系, 因此, 对虫草资源多样性的调查也是虫草相关研究的热点之一。此外, 形成虫草的真菌虽然只是一个物种, 但天然虫草及其微环境中存在着多种真菌, 高通量测序研究发现冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*)内含有丰富的真菌资源<sup>[4-5]</sup>, 野生蝉花(*Cordyceps cicadae*)、新古尼异虫草(*Metacordyceps neogunnii*)的菌核具有多菌定殖现象<sup>[6-7]</sup>, 由此可见, 天然虫草中可能具有很多重要的真菌资源有待被研究和开发利用, 因此, 对虫草内生真菌的资源调查同样是真菌资源研究的重要内容。

微生物次级代谢产物是一类化学结构丰富多样并具有广泛生物活性和功能多样的天然产物, 是人类研究和开发新药的重要来源<sup>[8-9]</sup>。其中, 抗菌活性是在微生物及其活性代谢产物研究中挖掘得较多的方面<sup>[10]</sup>, 而且微生物产生的具有抑菌活性的天然产物已超过 2 300 种<sup>[11]</sup>。目前, 人们对微生物抑菌活性的研究主要集中于普通环境微生物, 随着对该类资源的反复研究, 从中发现新型抗菌化合物的难度越来越大<sup>[12]</sup>。多种耐药菌的出现及不断增加也给临床治疗带来了一定的困难, 这就使得寻找新型抑菌活性成分满足临床需求成为迫切需要。因此, 人们

逐渐将研究方向转至海洋、沙漠、极地等特殊微生物环境<sup>[13]</sup>, 特殊生境来源的微生物为了适应环境需要, 在进化的过程中可能产生特殊的活性物质<sup>[14]</sup>。近年来的研究发现, 虫草及其内生真菌作为一类研究新兴的微生物资源, 是发现新活性化合物的潜在来源, 从中发现了大量结构新颖、类型丰富的生物活性物质, 如核苷、多糖、生物碱、环状缩羧肽和酶类等, 其抗菌、抗肿瘤及免疫调节等作用对维持人类健康具有重要的作用<sup>[15-16]</sup>。在抗菌研究方面, 经过多年的研究发现, 冬虫夏草(*O. sinensis*)发酵产物对金黄色葡萄球菌等具有较好的抑制作用<sup>[17]</sup>; 蛹虫草(*Cordyceps militaris*)作为重要的真菌资源, 富含多种活性物质, 其发酵液萃取物对金黄色葡萄球菌等细菌及绿色木霉具有明显的抑菌效果<sup>[18]</sup>; 蝉花虫草活性成分蝉花多糖对部分革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有抑制作用<sup>[19]</sup>; 戴氏绿僵菌(*Metarhizium taii*)菌丝体乙醚浸提液对金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌有明显的拮抗作用<sup>[20]</sup>; 深红虫草(*Cordyceps cardinalis*)和新疆细虫草(*Ophiocordyceps gracilis*)的提取物对金黄色葡萄球菌等细菌有较高的抗菌活性<sup>[21-22]</sup>。此外, 研究报道显示其他的虫生真菌如古尼拟青霉(*Paecilomyces gunni*)、斜链拟青霉(*Paccilomyces cateniobliquus*)等 40 株虫生真菌对白色念珠菌具有较强的抑菌活性<sup>[23]</sup>。除虫生真菌外, 分离自虫草的内生真菌同样具有多种抑菌活性作用。如分离自冬虫夏草的内生真菌蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepiali*) JY8-8 对 6 种革兰氏阳性菌和 4 种革兰氏阴性细菌、3 种皮肤致病真菌和 4 种植物病原真菌均表现出较好的抑菌活性<sup>[24]</sup>; 分离自冬虫夏草的高山被孢霉(*Mortierella alpina*) Cs-ZZ23 对大肠埃希菌和枯草芽胞杆菌有抑制作用<sup>[25]</sup>; 马赞等<sup>[26]</sup>从采自阿尔泰山脉的虫草(*Ophiocordyceps gracilis*)中发

现的菌株 *Penicillium canescens* SFY00C3 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用较强。由此可见, 虫草群落中不仅蕴藏着丰富多样的真菌资源, 从虫草及其相关真菌资源中挖掘抑菌活性物质同样具有巨大潜力。因此, 通过对虫草及其内生真菌的资源调查及抑菌活性研究将不断拓宽药用、生防资源, 为开发结构新颖、类型丰富的微生物活性代谢产物奠定基础, 对保护天然虫草物种具有一定的研究意义。

云南具有独特的地理条件, 具有丰富的生物资源, 是虫草物种多样性分布的重要地区之一, 目前已报道近 100 种虫草<sup>[27]</sup>。云南嵩明大哨位于北纬 25.40°、东经 102.92°; 平均海拔 2 640 m, 年平均气温 11 °C, 年降水量 1 200 mm; 山地气候类型多样, 其附近森林属滇东高原暖性阔叶林和暖性针叶林亚区, 树种丰富, 主要有针叶林、阔叶林、灌木林和竹林四大植被类型<sup>[28]</sup>, 其优势条件为虫草的生长提供了适宜的生态。课题组前期研究发现大哨的华山松林分布有大量的野生蛹虫草, 经免培养的方法发现天然蛹虫草微生物群落中分布有丰富的内生真菌及细菌类群, 而且具有不同的代谢潜能<sup>[29]</sup>。本研究对云南嵩明大哨的虫草物种进行调查采样, 利用组织分离法及形态学结合基因系统发育分析的方法对该地区虫草物种及虫草内生真菌进行分离鉴定, 并进行菌株抑菌活性研究, 以期考察云南嵩明大哨虫草及其内生真菌物种组成及多样性, 获得具有抑菌活性的菌株, 为从虫草及其内生真菌中挖掘新颖活性代谢产物奠定基础, 同时也为云南省虫草资源的挖掘及合理开发提供资料和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌株

虫草样本于 2020 年 9 月 25 日采自云南省

昆明市辖近郊嵩明县大哨(图 1), 共采集到 86 份虫草样本, 据经验及宏观形态学将其大致归类, 包括疑似蛹虫草样本(编号为“Y”) 16 份, 疑似高原线虫草样本(编号为“G”) 42 份, 以及寄生于不同昆虫的虫菌复合物样本(编号为“WZ”) 28 份, 所采集的虫草样本用无菌滤纸包好, 放入灭菌的收集管或密封袋中进行保鲜, 放置 4 °C 冰箱内保存。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

培养基成分、萘啶酮酸, 广东环凯生物科技有限公司; 通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 擎科生物(上海)科技有限公司; 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 擎科生物(上海)科技有限公司。高压蒸汽灭菌锅, 上海博迅实业有限公司; 恒温培养箱、生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 生物显微镜, 北京悦昌行科技有限公司。

#### 1.1.3 病原指示菌

病原指示细菌有耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA-1591、MRSA-1505 和 MRSA-2024)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC 6633、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) ATCC 19606 及粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) ATCC 29212; 植物病原指示真菌有黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、水稻恶苗病菌(*Fusarium fujikuroi*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme* Sheld)及禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)。以上供试菌株实验室前期已研究保存。

#### 1.1.4 培养基

LB 培养基参照文献[30]配制, 用来培养病原细

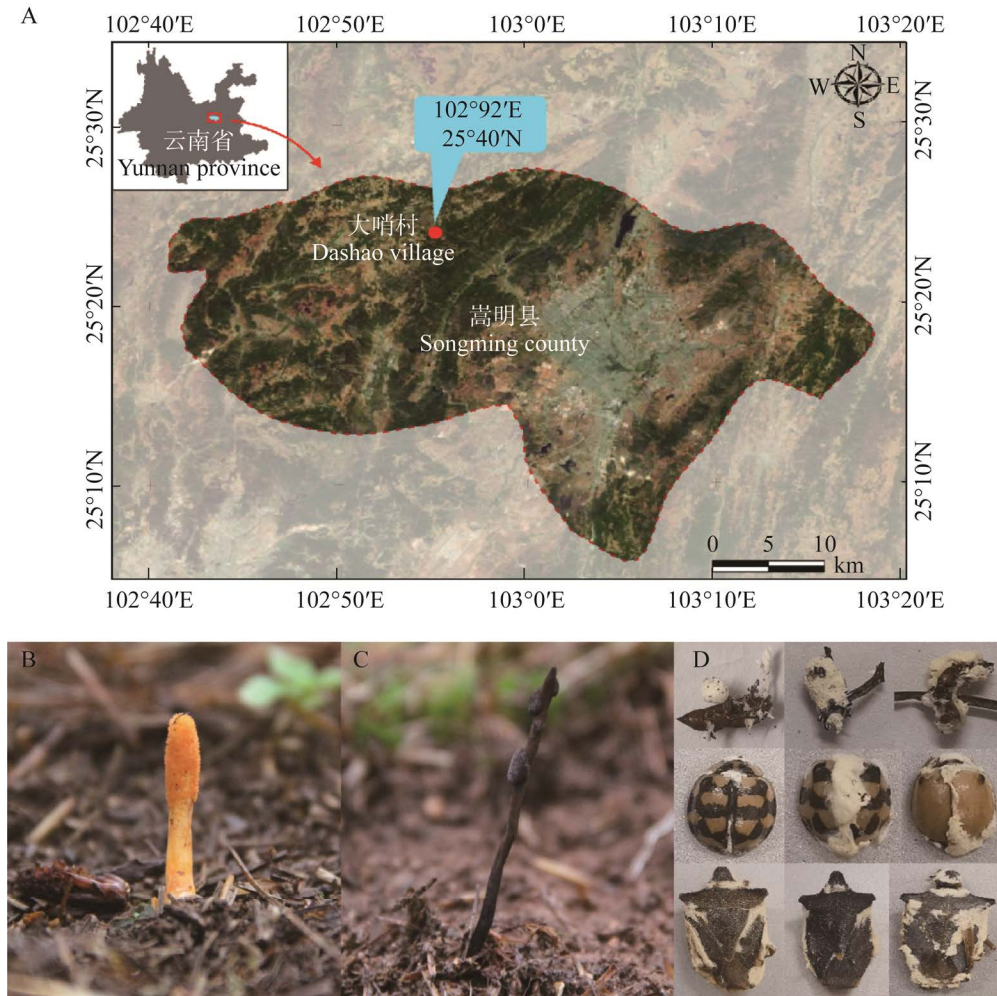


图 1 采集自云南嵩明大哨的虫草样本 A: 野生虫草物种自然栖息地; B: 蛹虫草; C: 高原线虫草; D: 疑似白僵菌

Figure 1 *Cordyceps* samples collected from Dashao village, Songming county, Yunnan province. A: The natural habitat of *Cordyceps* species; B: *C. militaris*; C: *Ophiocordyceps highlandensis*; D: Suspected *Beauveria* spp..

菌; 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基参照文献[31]配制, 用来培养虫生真菌及其内生真菌、病原真菌。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株的分离与保藏

根据采集材料的不同, 采取组织分离法进行菌种的分离<sup>[32-33]</sup>。将编号为“Y”和“G”的虫草样本先用无菌水清洗, 去除表面杂质, 75%酒精表面消毒 2-3 min, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液浸泡 3-5 min, 再用无菌水冲洗 3 次<sup>[34]</sup>。用无菌工具挑取以上

两种虫草样本离菌核表面较远的组织约米粒大小, 放于加入 50 mg/L 萘啶酮酸的 PDA 培养基上, 于 25 °C 恒温避光培养。将编号为“WZ”的样本用无菌工具挑取虫体表面少量粉状真菌于加入 50 mg/L 萘啶酮酸的 PDA 培养基表面接种(“Z”字形画线), 在相同的温度条件下进行培养。待菌落长出后, 根据菌落形态颜色等特征挑取单菌落接种于 PDA 培养基上, 25 °C 恒温培养纯化去重复后, 将纯化的菌株鉴定、分类并 4 °C

保藏。

### 1.2.2 菌株的鉴定

对本研究采集到的虫草物种, 基于形态观察及内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)联合 5 基因(*nrSSU*、*nrLSU*、*tef-1a*、*rpb1*、*rpb2*)系统发育分析进行物种准确鉴定<sup>[35]</sup>; 对于所分离得到的虫草内生真菌主要基于无性型形态特征及 ITS 基因系统发育分析进行鉴定。虫生真菌的多基因系统发育分析根据范琪<sup>[36]</sup>的方法对所分离的虫生真菌进行 ITS 联合 *nrSSU*、*nrLSU*、*tef-1a*、*rpb1*、*rpb2* 多基因扩增, 对所分离的虫草内生真菌参考赵玉瑛等<sup>[37]</sup>方法对其进行 ITS 区域扩增。PCR 产物经凝胶电泳检测后, 将产物送至擎科生物(上海)科技有限公司测序。根据测序结果, 所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对找到相似序列, 通过 MEGA-X<sup>[38]</sup> (最大似然法)软件基于 ITS 序列分别构建虫生真菌、虫草内生真菌的系统发育树, 以确定其分类地位。

### 1.2.3 抑菌活性检测

抑细菌活性检测采用平板对峙法, 将病原指示细菌分别接种至液体 LB 培养基中, 于 37 °C、220 r/min 振荡培养 18 h 作为菌种。取病原指示细菌菌种 100  $\mu$ L 与 200 mL 灭菌 PDA 培养基混匀后倒平板, 对照组加等量的无菌水。用直径 4 mm 的打孔器在培养 4 d 已分离纯化的待测真菌菌落取菌饼, 菌丝面朝下接种到含病原指示细菌菌液的平板上, 28 °C 恒温黑暗培养 48 h 后, 用游标卡尺测量抑菌圈的直径。同样采用平板对峙法筛选有拮抗作用的待测真菌。在 PDA 平板中央放置直径为 4 mm 指示菌饼, 再在其两端相距 2–3 cm 处各放置一块已分离鉴定得到的待测真菌菌饼, 对照组仅接种植物病原指示真菌, 25 °C 黑暗培养 5 d 后, 观察是否有抑菌带产生, 采用十字交叉法测量菌

落生长直径, 取平均值, 计算拮抗率(拮抗率  $\geq 75\%$  为强拮抗能力,  $50\% \leq$  拮抗率  $< 75\%$  为较强拮抗力,  $50\% <$  拮抗率为弱拮抗能力)<sup>[39]</sup>。拮抗率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径  $\times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 虫生真菌及其内生真菌的鉴定

本研究从云南嵩明大哨共收获包括编号为“Y”(16 份)、“G”(42 份)、“WZ”(28 份)在内的 86 份天然虫草样本。经分离后共获得 59 株真菌, 包括 33 株虫生真菌及 26 株虫草内生真菌。结合《真菌鉴定手册》<sup>[40]</sup>和《中国真菌志·第 32 卷》<sup>[15]</sup>中相关真菌的分类检索表, 利用形态特征观察(图 2)和构建 ITS 基因系统发育树(图 3)分析鉴定出该地区虫生真菌分属于 3 科 5 属 7 种(表 1), 分别是虫草科(*Cordycipitaceae*)的蛹虫草(*Cordyceps militaris*)、球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)、拟球孢白僵菌(*Beauveria pseudobassiana*)、*Samsoniella hepiali*、白束鳞翅虫草(*Samsoniella alboaurantium*)、麦角菌科(*Clavicipitaceae*)的 *Metapochonia suchlasporia*, 以及线虫草科(*Ophiocordycipitaceae*)的高原线虫草(*Ophiocordyceps highlandensis*), 其中高原线虫草(*Ophiocordyceps highlandensis*)截至目前无法分离纯培养<sup>[41]</sup>, 本研究根据经验通过对其实体的宏观形态学观察(子座从金龟总科 *Scarabaeoidea* 幼虫头部长出, 单生, 不分枝, 深黑褐色, 光滑; 可育部分膨大呈椭圆形, 生于柄中上端)及总 DNA 多基因联合分析进行物种鉴定。本研究中虫草真菌寄主主要涉及鳞翅目、鞘翅目、半翅目等动物, 其中以鞘翅目为主。

利用形态特征观察(图 4)和构建 ITS 基因系统发育(图 5)分析显示共分离鉴定得到 26 株虫草内生真菌, 分属于 9 科 9 属(表 2), 包括螺旋



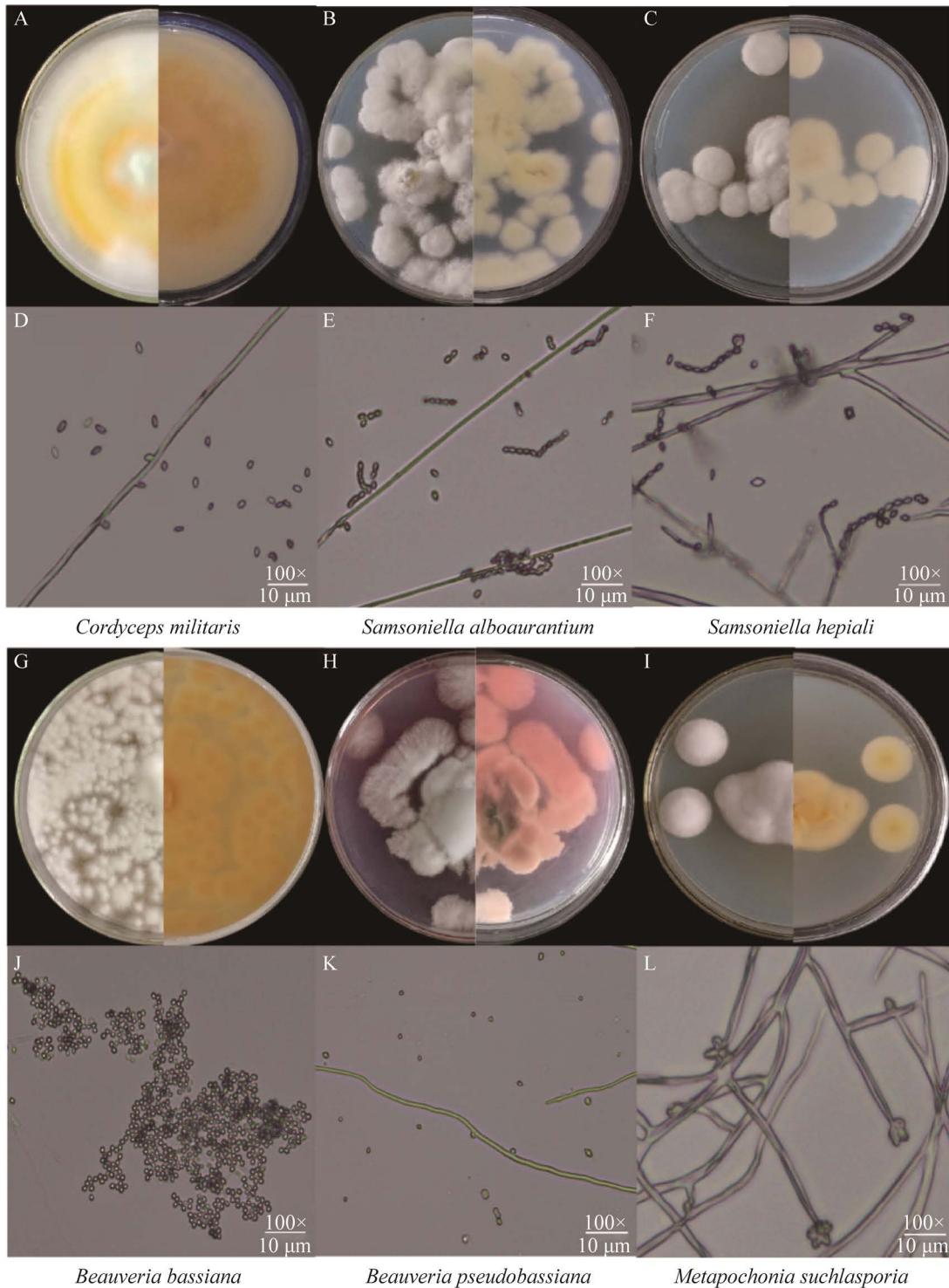


图 2 虫生真菌无性分离菌株形态特征 A-C 和 G-I: 菌落形态; D-F 和 J-L: 产孢结构; 标尺: 10 μm

Figure 2 The characteristics and microscopic features of entomogenous fungi. A-C and G-I: Colony on PDA; D-F and J-L: Conidiogenous structures; Bars: 10 μm.

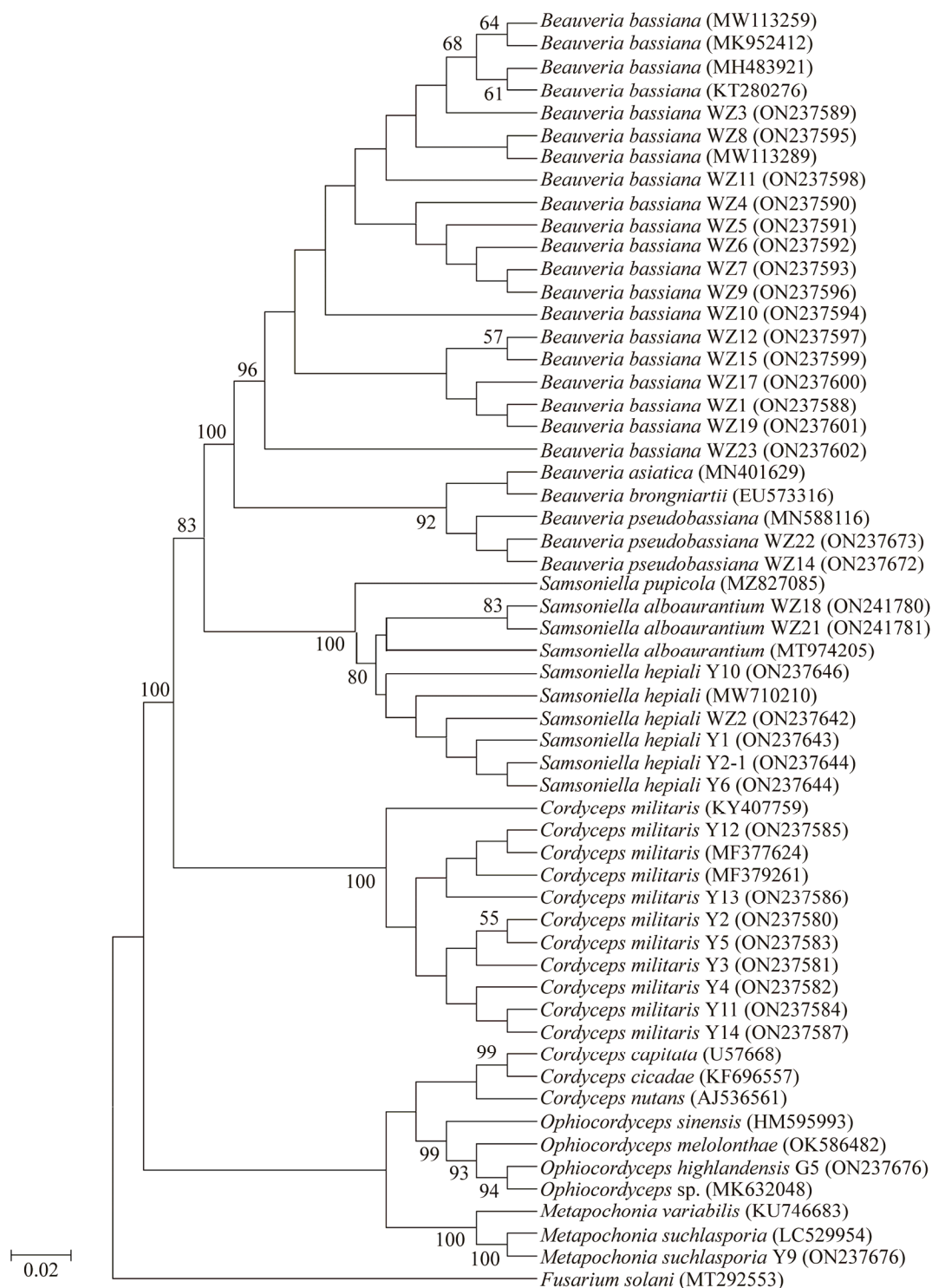


图3 基于 ITS 序列构建 7 种虫生真菌系统发育树 编号为“Y” “WZ” “G”的菌株为本研究所得，其后括号内序号为该菌株 GenBank 序列号；内部节点数字为支持度，用于代表该分支结构的可靠程度。下同  
 Figure 3 Phylogenetic tree of seven entomogenous fungi based on ITS sequence. The strains numbered Y, WZ, and G were obtained by this study, and the serial number in bracket is the GenBank serial number of the strain. The number of internal nodes is support value, which represents the reliability of the branch structure. The same below.



表 1 云南嵩明大哨分离鉴定所得的虫生真菌

Table 1 The entomogenous fungi collected and identified from Dashao village, Songming county, Yunnan province

Species	Genus	Family	Number of isolates	Percentage (%)
<i>Cordyceps militaris</i>	<i>Cordyceps</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	8	24
<i>Samsoniella hepiali</i>	<i>Samsoniella</i>		5	15
<i>Samsoniella alboaurantium</i>			2	6
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	<i>Beauveria</i>		2	6
<i>Beauveria bassiana</i>			15	46
<i>Metapochonia suchlasporia</i>	<i>Metapochonia</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	1	3

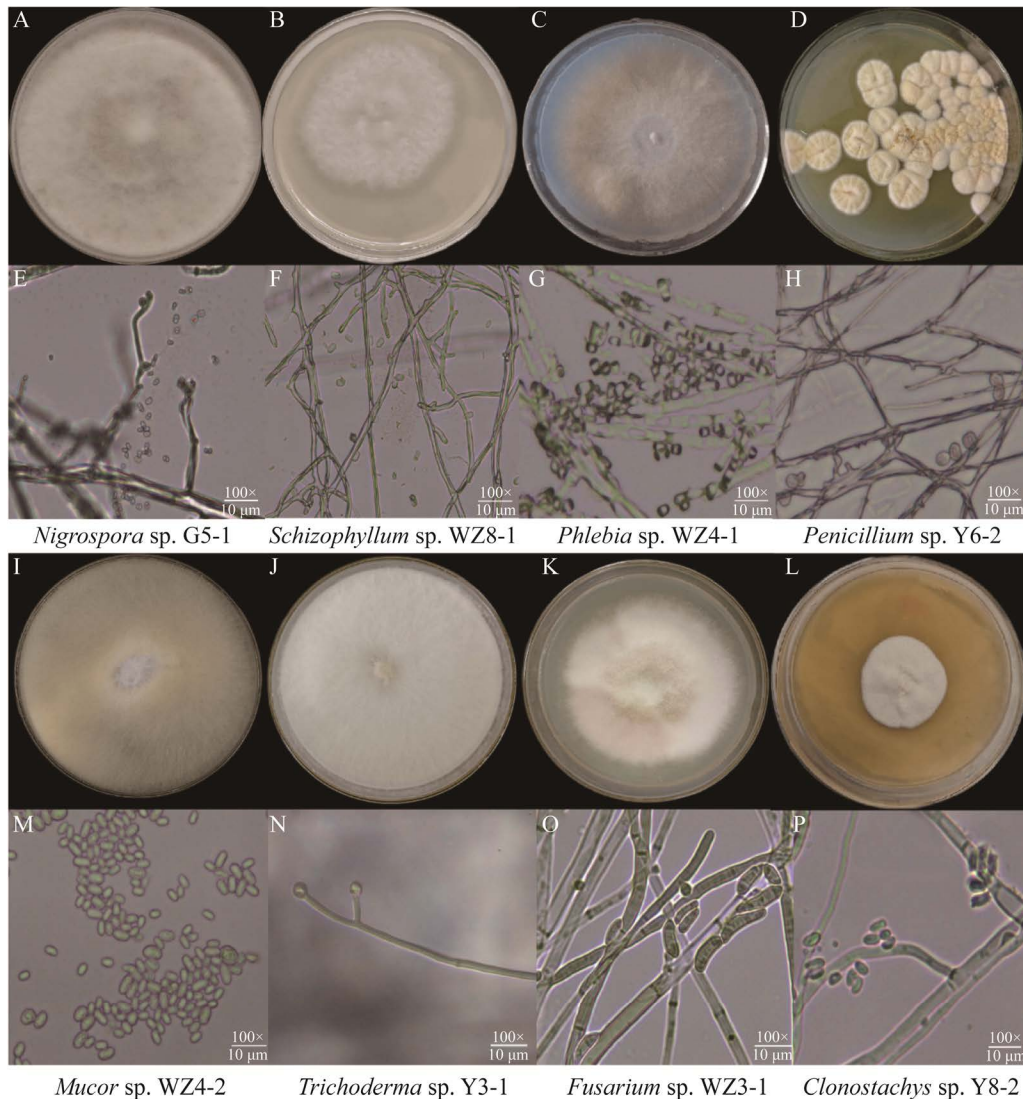


图 4 部分虫草内生真菌无性分离菌株形态特征 A-D 和 I-L: 菌落形态; E-H 和 M-P: 产孢结构; 标尺: 10  $\mu$ m

Figure 4 The characteristics and microscopic features of typical endophytic fungi from *Cordyceps* samples. A-D and I-L: Colony on PDA; E-H and M-P: Conidiogenous structures; Bars: 10  $\mu$ m.

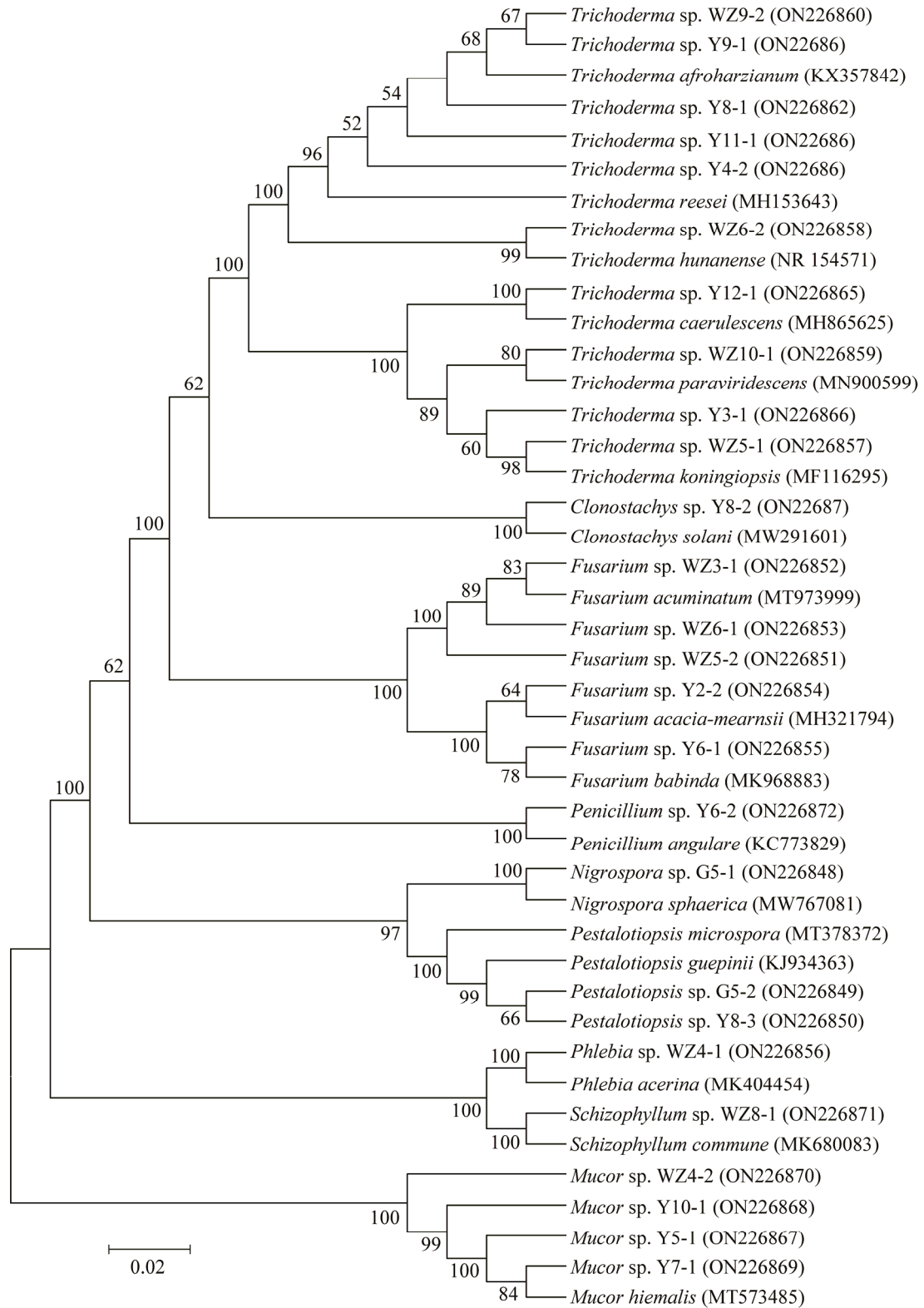


图 5 基于 ITS 序列构建虫草内生真菌的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of endophytic fungi based on ITS sequence.

表 2 分离自虫草物种的内生真菌

Table 2 Endophytic fungi isolated from natural *Cordyceps* species

Classification status		Sources			Number of isolates	Percentage (%)
Family	Genus	Y	WZ	G		
<i>Bionectriaceae</i>	<i>Clonostachys</i>	1	—	—	1	4
<i>Melanconiaceae</i>	<i>Pestalotiopsis</i>	1	—	1	2	8
<i>Trichocomaceae</i>	<i>Penicillium</i>	1	—	—	1	4
<i>Mucoraceae</i>	<i>Mucor</i>	3	1	—	4	15
<i>Moniliaceae</i>	<i>Trichoderma</i>	6	4	—	10	38
<i>Tubeculariaceae</i>	<i>Fusarium</i>	2	3	—	5	19
<i>Dematiaceae</i>	<i>Nigrospora</i>	—	—	1	1	4
<i>Schizophyllaceae</i>	<i>Schizophyllum</i>	—	1	—	1	4
<i>Corticaceae</i>	<i>Phlebia</i>	—	1	—	1	4
Toall		14	10	2	26	100

注：—：菌属未从该样本中分离到

Note: —: The genus was not isolated from the samples.

聚孢霉属 (*Clonostachys*)、拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*)、青霉属 (*Penicillium*)、毛霉属 (*Mucor*)、木霉属 (*Trichoderma*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、黑孢霉属 (*Nigrospora*)、褶菌属 (*Schizophyllum*) 和射脉菌属 (*Phlebia*) 9 个属, 以上菌属与 GenBank 数据库中与其最相近菌株的相似性均为 99%–100%, 其中木霉属 (*Trichoderma*) 和镰刀菌属 (*Fusarium*) 为此次分离鉴定所得优势菌属, 分别占虫草内生真菌分离菌株总数的 38% 和 19%。由此可见, 云南嵩明大哨分布的虫生真菌及其内生真菌具有一定的物种多样性。

## 2.2 所分离真菌的抑菌活性

对所分离保存的真菌按其分离源及种类归属, 从虫生真菌和内生真菌菌株中共挑取 20 株代表性菌株进行病原细菌、植物病原真菌抑菌活性研究。结果表明, 测试菌株中有 11 株真菌对 2 株及以上病原细菌具有不同程度的抑制作用; 其中有 10 株菌对 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 有不同程度的抑制活性, 占受试菌株总数的 50% (表 3)。有 13 株真菌对一株以上植物病原真菌具有拮抗能力 (表 4), 其中对 *Fusarium*

*oxysporum* f. sp. *cucumerinum*、*Fusarium fujikuroi*、*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*、*Fusarium moniliforme* Sheld 和 *Fusarium graminearum* 具有较强及以上拮抗能力 (50% ≤ 拮抗率) 的菌株分别有 6、11、10、8、7 株。在这些具有抑菌活性的菌株中, *Clonostachys* sp. Y8-2 对 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 及 MRSA-1591 有明显抑制作用, 对 5 株植物病原真菌无拮抗能力; *Schizophyllum* sp. WZ8-1、*Nigrospora* sp. G5-1、*Pestalotiopsis* sp. G5-2、*Pestalotiopsis* sp. Y8-3、*Mucor* sp. Y10-1 和 *Fusarium* sp. WZ6-1 对 5 株植物病原真菌具有不同程度的拮抗作用, 而且至少对 1 株植物病原真菌具有较强拮抗能力, 对病原细菌无明显抑制作用。*Trichoderma* sp. Y3-1 和 *Fusarium* sp. WZ3-1 对病原细菌 MRSA-1591、MRSA-1505、*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 和 *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 均具有明显抑制作用, 同时对 5 株植物病原真菌同样具有不同程度拮抗能力, 而且至少对 3 株以上植物病原真菌具有较强拮抗能力 (图 6), 提示两菌株具有广谱抗菌活性。

表 3 部分菌株对病原细菌的抑菌活性

Table 3 Antibacterial activities of typical strains

Strains No.	Inhibition zone (mm)										
	Y3-1	Y6-1	Y6-2	Y8-2	Y9	Y12-1	WZ1	WZ3-1	WZ4-2	WZ5-1	WZ5-2
MRSA-1591	10.00	-	5.05	16.19	7.15	10.22	-	10.37	-	-	-
MRSA-1505	20.06	-	20.24	-	-	-	5.44	20.16	-	20.10	-
MRSA-2024	-	4.55	-	-	-	5.43	4.68	8.29	8.33	-	5.65
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20.33	15.18	-	16.37	10.11	20.21	8.53	8.55	5.54	20.22	20.08
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	4.88	8.12	-	4.59	-	-	-	5.23	4.66
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	20.05	5.56	-	10.10	-	-	15.19	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	25.25	4.78	20.21	-	-	-	-	20.32	-	25.14	-

注: -: 抑菌圈直径为 0; 菌株编号带有“-”的代表虫草内生真菌, 未带有“-”的表示虫生真菌; 菌株编号同图 3 和图 5

Note: -: The diameter of the bacteriostatic circle was 0; Strain numbered with “-” represent endophytic fungi, while those without “-” represent entomogenous fungi; Strain numbers are the same as those in Figure 3 and Figure 5.

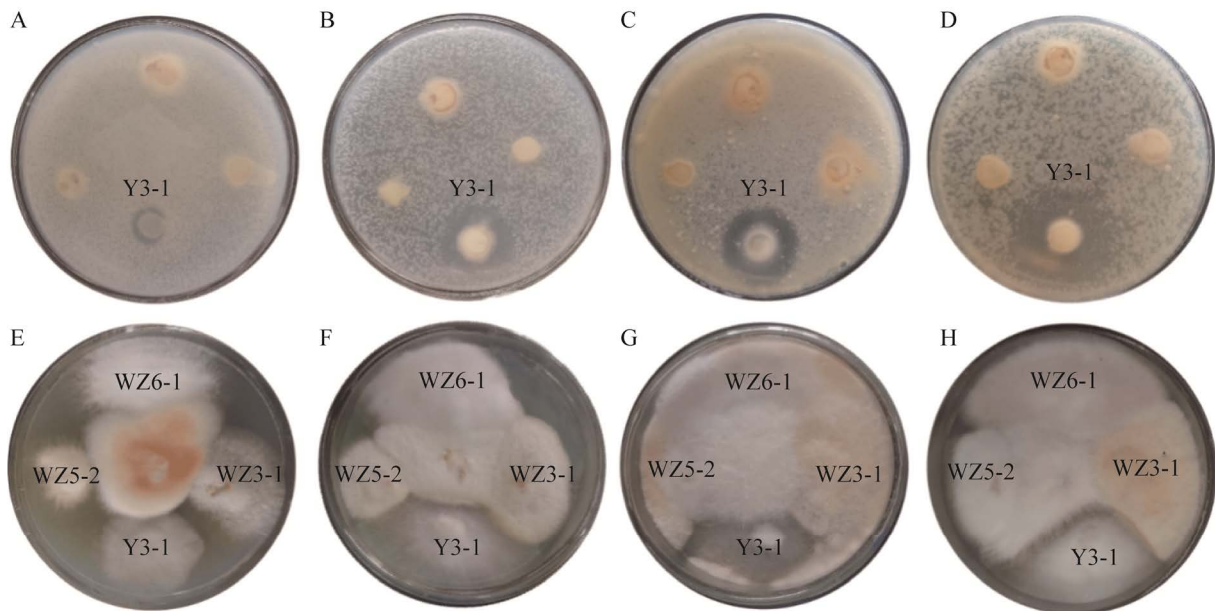
表 4 部分菌株对植物病原真菌的拮抗作用

Table 4 Antagonistic effects of some strains against plant pathogenic fungi (antagonism rate (%))

Strains No.	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	<i>Fusarium fujikuroi</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i> Sheld	<i>Fusarium graminearum</i>
Y3-1	56	54	66	53	63
Y6-1	-	50	-	-	-
Y6-2	-	47	66	54	-
Y8-3	-	-	-	71	-
Y9	-	-	60	43	-
Y10-1	-	66	45	34.5	-
WZ1	-	66	60	51	-
WZ3-1	43	61	63	53	67
WZ4-2	-	63	48	51	-
WZ5-1	77	77	66	48	61
WZ5-2	50	56	61	44	60
WZ6-1	56	59	61	38	63
WZ8-1	60	-	-	44	-
G5-1	60	75	60	54	61
G5-2	-	75	60	54	61

注: -: 无拮抗作用

Note: -: No antagonistic activity.



**图 6** 蛹虫草内生真菌 *Trichoderma* sp. Y3-1 的抗菌活性 A-D: 依次代表 MRSA-1591、MRSA-1505、*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 和 *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606; E-H: 依次代表 *Fusarium fujikuroi*、*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*、*Fusarium moniliforme* Sheld 和 *Fusarium graminearum*

Figure 6 Antimicrobial activities of *Trichoderma* sp. Y3-1 isolated from natural *Cordyceps militaris*. A-D: represent MRSA-1591, MRSA-1505, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, and *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, respectively; E-H: represent *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *Fusarium moniliforme* Sheld, and *Fusarium graminearum*, respectively.

### 3 讨论

#### 3.1 云南嵩明大哨地区蕴藏丰富多样的虫生真菌及其内生真菌资源

本次采样点为云南嵩明大哨, 其生态系统具有较强的整体性和独特性, 森林茂密, 地形地貌复杂, 山地气候类型多样, 孕育了丰富的生物资源, 同时也孕育了丰富的虫生真菌及其内生真菌资源。本研究通过纯培养分离的方法研究了云南嵩明大哨不同虫草群落的物种组成, 研究表明, 云南嵩明大哨蕴藏多样虫生真菌及内生真菌资源, 其物种多样性较高, 同时也证实不同虫草中生活着不同种类的真菌, 研究结果有利于认识虫草群落中真菌物种的多样性, 为后期虫草及其相关真菌的开发

利用提供实验依据。同时, 本研究发现大哨地区虫草资源优势种属现象明显, 优势属为线虫草属和白僵菌属, 优势种为高原线虫草和球孢白僵菌, 其中高原线虫草寄主专一, 多为鞘翅目金龟总科(*Scarabaeoidea*)幼虫, 而球孢白僵菌寄主分布广泛, 包括半翅目和鞘翅目等动物。结果表明, 在大哨森林生态系统中虫生真菌的优势种属占重要地位, 对森林害虫的调控起着一定的作用。

#### 3.2 云南嵩明大哨地区虫生真菌及其内生真菌资源中包括多种抑菌活性菌株

虫草作为一类复杂的虫草复合体, 其种类繁多、数量庞大, 具有丰富而又独特的抗细菌活性, 但其作为植物病原菌拮抗菌的研究起步较晚, 报道较少。研究显示, 金龟子绿僵菌(*Metarhizium*



*anisopliae*)能明显抑制小麦纹枯病菌菌丝生长<sup>[42]</sup>;白僵菌(*Beauveria* sp.)能定殖在植物根际并对植物病原真菌具有抑制作用<sup>[43]</sup>。此外,从大团囊虫草(*Elaphocordyceps ophioglossoides*)中分离到的新型抗生素 ophiocordin 具有广谱抗菌性,对不同种类真菌均表现出抗性<sup>[44]</sup>;从异足虫草(*Cordyceps heteropoda*)发酵液中分离到的新型多肽类化合物I和II,以及抗真菌类抗生素多球壳菌素 myriocin 对真菌灰葡萄孢霉有抑制作用<sup>[45]</sup>。由此可见,将虫生真菌作为植物病原菌拮抗菌可能蕴藏巨大潜力。在本研究中,从不同虫生真菌和内生真菌菌株中挑选的 20 株中大部分具有良好的抑菌活性,其中虫生真菌 *Beauveria bassiana* WZ1 和 *Metapochonia suchlasporia* Y9 对多株病原细菌及植物病原真菌均具有不同程度的拮抗能力,虫生真菌 *Metapochonia suchlasporia* Y9 目前还未见关于其次生代谢产物的研究报道,提示该菌株中可能含有新型抑菌活性成分,值得进一步挖掘,这为虫生真菌对植物的生物防治提供了材料来源和理论基础。

长期生活在同一环境中的生物在协同进化的过程中可能会产生结构类似的代谢产物<sup>[46]</sup>。冬虫夏草具有抗肿瘤、免疫调节、降血糖、抗氧化、改善肾功能等药理学作用,从分离自冬虫夏草的蝙蝠蛾柱霉(*Scytalidium hepiali*)、中国弯颈霉(*Tolypocladium sinense*)和蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)中发现了大量的新化合物,这些化合物同样具有抗菌、抗 HIV 和抗肿瘤等生物活性<sup>[47]</sup>。本研究对分离自不同虫草的内生真菌进行了抑菌活性研究,结果显示大哨地区蕴藏多株具有广谱抑菌活性的虫草内生真菌,有 9 株真菌对 2 株及以上革兰氏阳性菌表现出较好的抑菌活性,其中有 5 株真菌对革兰氏阴性菌 *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 有抑

制作用,提示虫草内生真菌对革兰氏阳性菌具有一定的抑菌选择性,如 *Clonostachys* sp. Y8-2 对 4 株革兰氏阳性菌(含一株 MRSA)有明显抑制作用,分离自海洋的同属物种 *Clonostachys rose* 对多种病原细菌同样具有抑制作用<sup>[48]</sup>。此外,作为虫草内生真菌优势属代表的 *Trichoderma* sp. Y3-1、WZ5-1 及 *Fusarium* sp. Y6-1、WZ3-1 不仅对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌表现出较好的抑菌活性,对植物病原真菌也具有不同程度拮抗能力。其中,本研究所获优势菌株 *Trichoderma* sp. Y3-1 和 *Fusarium* sp. WZ3-1 对多株病原细菌和真菌具有广谱抑制能力,可作为挖掘抗菌活性物质的优选菌株。由此可见,虫草群落中的真菌可能具有产生多种抑菌活性物质的潜力,这对于我们从虫草及其内生真菌资源中挖掘新型抑菌活性物质提供了参考依据,值得进行抑菌活性代谢产物挖掘。另外,本研究中具有抑菌活性的菌株主要分离自不同的虫草中,特殊生境中分离纯化获得的微生物菌株适应能力很强,菌种稳定易培养,其菌株的代谢方式可能也不同于普通生境,因此也可能产生一些结构特殊、活性很强的次生代谢产物,从中挖掘菌株的代谢产物及新活性成分有利于保护、扩展天然产物资源。

## 4 结论

通过对云南嵩明大哨的虫草物种调查研究,发现该地区分布有包括蛹虫草、球孢白僵菌、拟球孢白僵菌、*Samsoniella hepiali*、白束鳞翅虫草、*Metapochonia suchlasporia* 及高原线虫草在内的多种虫生真菌物种,同时从采集到的虫草样本中分离鉴定得到 26 株分属于 9 科 9 属的内生真菌,其物种多样性较高。本研究通过对云南嵩明大哨地区天然虫生真菌及其内生真菌资源调查,丰富了该地区甚至云南省的虫生真菌

及其内生真菌资源, 也为其他地区的虫生真菌及其内生真菌的资源调查提供了一定参考。同时, 通过对虫生真菌及其内生真菌抑菌活性检测, 发现 11 株真菌对 2 株及以上病原细菌具有不同程度的抑制作用, 13 株真菌对 1 株以上植物病原真菌具有拮抗能力, 其中含多株具广谱抑菌活性的菌株, 值得进一步研究, 这也为后期挖掘活性代谢产物提供了参考菌株和实验依据。

## REFERENCES

- [1] Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi[J]. *Studies in Mycology*, 2007, 57: 5-59
- [2] 赵志远, 王志勤, 范琪, 汤德相, 孙涛, 王元兵, 耿宇鹏, 虞泓. 云南大理太极山自然保护区广义虫草物种多样性[J]. *生态科学*, 2021, 40(3): 128-135  
Zhao ZY, Wang ZQ, Fan Q, Tang DX, Sun T, Wang YB, Geng YP, Yu H. Species diversity of *Cordyceps sensu lato* in the Taiji Mountains Nature Reserve of Dali, Yunnan[J]. *Ecological Science*, 2021, 40(3): 128-135 (in Chinese)
- [3] 陈万浩, 刘畅, 韩燕峰, 梁建东, 田维毅, 梁宗琦. 广义虫草属二新记录种[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 710-717  
Chen WH, Liu C, Han YF, Liang JD, Tian WY, Liang ZQ. Two new recorded species in *Cordyceps sensu lato*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(3): 710-717 (in Chinese)
- [4] Xia F, Chen X, Guo MY, Bai XH, Liu Y, Shen GR, Li YL, Lin J, Zhou XW. High-throughput sequencing-based analysis of endogenetic fungal communities inhabiting the Chinese *Cordyceps* reveals unexpectedly high fungal diversity[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33437
- [5] Xia F, Liu Y, Shen GR, Guo LX, Zhou XW. Investigation and analysis of microbiological communities in natural *Ophiocordyceps sinensis*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2015, 61(2): 104-111
- [6] 曾召英, 许忠顺, 牟丹, 许绍欢, 杜飞, 周家喜, 邹晓. 蝉棒束孢内菌核、菌膜及其生境土壤真菌群落结构及生态功能分析[J]. *菌物学报*, 2019, 38(10): 1710-1723  
Zeng ZY, Xu ZS, Mou D, Xu SH, Du F, Zhou JX, Zou X. Analyses on the structure and ecological function of fungal community in sclerotia, external mycelial layer covering ossified cicada epidermis and habitat soil of *Isaria cicadae*[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(10): 1710-1723 (in Chinese)
- [7] 胡胜兰, 梁建东, 陈万浩, 邹晓, 韩燕峰, 梁宗琦. 新古尼异虫草内菌核的多菌定殖现象[J]. *菌物学报*, 2018, 37(9): 1199-1206  
Hu SL, Liang JD, Chen WH, Zou X, Han YF, Liang ZQ. Multiple fungi colonized in the endo-sclerotia of *Metacordyceps neogunnii*[J]. *Mycosystema*, 2018, 37(9): 1199-1206 (in Chinese)
- [8] Yong HS, Lim PE, Tan J, Eamsobhana P. Genetically determined colour polymorphism in larvae of *Ceriagrion chaoi* (Insecta: Odonata: Coenagrionidae)[J]. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 2013, 61(1): 47-51
- [9] Granzotti RV, Muniz CM, Gomes LC. Habitat complexity does not influence prey consumption in an experimental three-level trophic chain[J]. *Iheringia Série Zoologia*, 2018, 13(10): e0205162
- [10] 余波, 赵力, 曹建波, 彭远义. 植物内生菌活性物质研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2008, 14(3): 31-32, 84  
Yu B, Zhao L, Cao JB, Peng YY. Progress on active substances of plant endophytes[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2008, 14(3): 31-32, 84 (in Chinese)
- [11] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1): 1-26
- [12] 陈菲菲, 王勇, 王以光, 赫卫清. 海洋微生物来源的天然产物开发研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(2): 287-294  
Chen FF, Wang Y, Wang YG, He WQ. Advance in research and development of natural products from marine microorganisms[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2011, 17(2): 287-294 (in Chinese)
- [13] 刘柳. 秦岭鳞翅目昆虫内生真菌分离鉴定及活性代谢产物研究[D]. 汉中: 陕西理工大学硕士学位论文, 2020  
Liu L. Isolation, identification and activity of the endophytic fungi of *Lepidopteran* in Qinling[D]. Hanzhong: Master's Thesis of Shaanxi University of Technology, 2020 (in Chinese)
- [14] 卢圳域. 特殊环境微生物的次生代谢产物研究[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2009  
Lu ZY. Studies on bioactive secondary metabolites of microorganisms from extraordinary environments[D].

- Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2009 (in Chinese)
- [15] 梁宗琦. 中国真菌志. 第三十二卷, 虫草属[M]. 北京: 科学出版社, 2007
- Liang ZQ. Chinese Fungi, Volume 32, *Cordyceps*[M]. Beijing: Science Press, 2007 (in Chinese)
- [16] 傅岚, 陈作红. 虫草属真菌化学成分及药理作用研究进展[J]. 生命科学研究, 2004, 8(1): 1-7
- Fu L, Chen ZH. Research advances of chemical constituents and pharmacological activities of *Cordyceps*[J]. Life Science Research, 2004, 8(1): 1-7 (in Chinese)
- [17] 魏涛, 魏威凛, 贡晓娟, 金宗濂. 冬虫夏草菌丝体镇咳、祛痰及抗菌消炎作用的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 126-130
- Wei T, Wei WL, Gong XJ, Jin ZL. Study on functions of *Cordyceps sinensis* mycelium about cough-relief, expectorant effect, antiseptis and anti-inflammatory effect[J]. Food Science, 2002, 23(3): 126-130 (in Chinese)
- [18] 邵颖, 陈宏伟, 柴文波, 蒋倩, 邵祝宝, 陈安徽. 蛹拟青霉发酵液中抑菌活性成分的分离纯化[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 116-120
- Shao Y, Chen HW, Chai WB, Jiang Q, Shao ZB, Chen AH. Isolation and purification of antibacterial components in fermentation broth of *Paecilomyces militaris*[J]. Food Science, 2012, 33(23): 116-120 (in Chinese)
- [19] 岑绮雯, 宋宇婧, 陈涛, 涂珍, 张瑜, 白雪莲, 石陆娥. 蝉花多糖提取工艺优化及抗菌活性初步研究[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2018, 17(3): 269-274
- Cen QW, Song YJ, Chen T, Tu Z, Zhang Y, Bai XL, Shi LE. Optimization of extraction technology for polysaccharide from *Cordyceps cicadae* and the preliminary investigation of its antibacterial activity[J]. Journal of Hangzhou Normal University: Natural Science Edition, 2018, 17(3): 269-274 (in Chinese)
- [20] 肖代敏, 肖建辉, 张志敏, 孙中华. 戴氏绿僵菌抗微生物潜力的评估[J]. 中药材, 2010, 33(6): 952-957
- Xiao DM, Xiao JH, Zhang ZM, Sun ZH. Antimicrobial potential of *Metarhizium taii* *in vitro*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2010, 33(6): 952-957 (in Chinese)
- [21] 李义勇, 陈玉婵, 李冬利, 张亚雄, 章卫民. 几种虫草菌发酵提取物的抗菌抗肿瘤活性研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 88-90, 93
- Li YY, Chen YC, Li DL, Zhang YX, Zhang WM. Antimicrobial and antitumor activities of fermentative extracts from several *Cordyceps* strains[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(6): 88-90, 93 (in Chinese)
- [22] 索菲娅, 黄罗冬, 李萍, 张琳, 王傲立. 新疆细虫草抑菌及抗氧化作用的初步研究[J]. 食用菌学报, 2014, 21(1): 51-54
- Suo FY, Huang LD, Li P, Zhang L, Wang AL. Antibacterial and antioxidant activities of a *Ophiocordyceps gracilis* strain from Xinjiang[J]. Acta Edulis Fungi, 2014, 21(1): 51-54 (in Chinese)
- [23] 邵颖, 丁婷, 葛飞, 樊美珍, 胡丰林. 40株虫生真菌发酵液对白色念珠菌的抑制作用[J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32(3): 328-331
- Shao Y, Ding T, Ge F, Fan MZ, Hu FL. Effects of metabolites from 40 entomogenous fungi strains on anti *Candida albicans* activities[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2005, 32(3): 328-331 (in Chinese)
- [24] 刘俊, 杨本寿, 姜国银. 蝙蝠蛾拟青霉的抑菌活性与菌丝体发酵化学组分的研究[J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(6): 32-34, 38
- Liu J, Yang BS, Jiang GY. Antibiotic activities and chemical composition of mycelia of a strain *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai[J]. Journal of Kunming Medical University, 2012, 33(6): 32-34, 38 (in Chinese)
- [25] 于帮红, 徐慧, 张传博. 一株冬虫夏草来源真菌的鉴定及抑菌活性检测[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 36-40
- Yu BH, Xu H, Zhang CB. Identification of fungi from *Cordyceps sinensis* and its antibacterial activity[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 22(8): 36-40 (in Chinese)
- [26] 马赞, 索菲娅, 王傲立, 卢帅, 叶星, 龚健. 不同居群的新疆虫草发酵液体外抗氧化活性的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(6): 792-794
- Ma Y, Suo FY, Wang AL, Lu S, Ye X, Gong J. Study on antioxidation activity of the broth of different originated *Ophiocordyceps gracilis* (Grev.) G.H.Sung, J.M.Sung, Hywel-Jones & Spatafora *in vitro*[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2012, 33(6): 792-794 (in Chinese)
- [27] 赵志远, 王元兵, 王志勤, 汤德相, 耿宇鹏, 虞泓. 云南巍山地区广义虫草的物种多样性研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2020, 28(5): 455-462
- Zhao ZY, Wang YB, Wang ZQ, Tang DX, Geng YP, Yu H. Species diversity of *Cordyceps sensu lato* in

- Weishan, Yunnan[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2020, 28(5): 455-462 (in Chinese)
- [28] 嵩明县林业局. 嵩明县林业志[M]. 昆明: 云南民族出版社, 1989, 60: 67
- Songming County Forestry Bureau. Forestry chronicle of Songming County[M]. Kunming: the Nationalities Publishing House of Yunnan, 1989, 60: 67 (in Chinese)
- [29] Zhang XM, Tang DX, Li QQ, Wang YB, Xu ZH, Li WJ, Yu H. Complex microbial communities inhabiting natural *Cordyceps militaris* and the habitat soil and their predicted functions[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2021, 114(4): 465-477
- [30] 刘梅, 张新建, 周方园. 葱地种蝇幼虫伴生细菌多样性及两种培养基分离效果比较[J]. 福建农业学报, 2022, 37(1): 84-95
- Liu M, Zhang XJ, Zhou FY. Diversity and isolation of symbiotic bacteria on *Delia antiqua* larvae[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37(1): 84-95 (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, (6): 1097-1099
- Rao YX, Lang MR, Jiang H, Tong XQ, Wang YJ. Isolation and cultivation of a *Cordyceps cicadae* strain from Tianmu mountain in Zhejiang[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Science, 2021, (6): 1097-1099 (in Chinese)
- [32] 梁宗琦, 刘爱英, 黄建忠, 焦彦朝. 桫欏自然保护区的虫草及其相关真菌[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 9-14
- Liang ZQ, Liu AY, Huang JZ, Jiao YC. Some *Cordyceps* species and their allies from Suoluo Nature Preserve in Guizhou[J]. Mycosystema, 2002, 21(1): 9-14 (in Chinese)
- [33] 王元兵. 多头霉新科系统发育研究: 兼论多枝多头霉及其寄主微生物多样性[D]. 昆明: 云南大学博士学位论文, 2016
- Wang YB. Studies on phylogeny of *Polycephalomyectaceae* fam. nov., with microbial diversities of *Polycephalomyces multiramosus* and its host[D]. Kunming: Doctoral Dissertation of Yunnan University, 2016 (in Chinese)
- [34] 冯云利, 陈惠, 陈正启, 郑慧华, 方媛, 华蓉, 郭相, 孙达锋. 高原线虫草重寄生菌的鉴定及培养[J]. 中国食用菌, 2021, 40(1): 75-78
- Feng YL, Chen H, Chen ZQ, Zheng HH, Fang Y, Hua R, Guo X, Sun DF. Identification and culture of the mycoparasite of *Ophiocordyceps highlandensis*[J]. Edible Fungi of China, 2021, 40(1): 75-78 (in Chinese)
- [35] Chen ZH, Dai YD, Yu H, Yang K, Yang ZL, Yuan F, Zeng WB. Systematic analyses of *Ophiocordyceps lanpingensis* sp. nov., a new species of *Ophiocordyceps* in China[J]. Microbiological Research, 2013, 168(8): 525-532
- [36] 范琪. 昆明地区广义虫草分类与系统发育初步研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2020
- Fan Q. A preliminary study on taxonomy and phylogeny of *Cordyceps sensu lato* in Kunming[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2020 (in Chinese)
- [37] 赵玉琰, 黄之镡, 张琼, 赵庆, 柏叶涛, 张晓梅. 剑叶龙血树内生真菌的分离及体外抑菌活性筛选[J]. 广西植物, 2021, 41(7): 1126-1134
- Zhao YY, Huang ZP, Zhang Q, Zhao Q, Bai YT, Zhang XM. Isolation of endophytic fungi from *Dracaena cochinchinensis* and their antimicrobial activities[J]. Guihaia, 2021, 41(7): 1126-1134 (in Chinese)
- [38] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549
- [39] 严冬, 曾为林, 陈肖学, 刘云, 王连春, 刘惠民, 赵平. 樟叶越桔嫩枝内生真菌的植物病原菌拮抗活性[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41(3): 64-71
- Yan D, Zeng WL, Chen XX, Liu Y, Wang LC, Liu HM, Zhao P. Phytopathogenic antagonistic activities of the endophytic fungi from the twigs of *Vaccinium dunalianum*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2021, 41(3): 64-71 (in Chinese)
- [40] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- Wei JC. Fungal Identification Manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979 (in Chinese)
- [41] 汤德相, 王元兵, 李程鹏, 赵志远, 徐志鸿, 虞泓. 高原线虫草子座、菌核及生境土壤真菌多样性分析[J]. 食用菌学报, 2021, 28(2): 100-107
- Tang DX, Wang YB, Li CP, Zhao ZY, Xu ZH, Yu H. Fungal diversity analysis on stroma, sclerotium, and habitat soil of *Ophiocordyceps highlandensis*[J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(2): 100-107 (in Chinese)
- [42] 齐永霞, 陈方新, 李增智. 绿僵菌对小麦纹枯病菌的抑制作用研究[J]. 激光生物学报, 2011, 20(6): 758-764
- Qi YX, Chen FX, Li ZZ. Inhibitory mechanisms of *Metarhizium anisopliae* against *Rhizoctonia cerealis*[J].

- Acta Laser Biology Sinica, 2011, 20(6): 758-764 (in Chinese)
- [43] 齐永霞. 白僵菌和绿僵菌在植物根际的定殖及对几种土传植物病原真菌的抑制作用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学博士学位论文, 2011
- Qi YX. Colonization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in plant rhizosphere and its inhibition on some soil-borne phytopathogenic fungi[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of Anhui Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [44] Kneifel H, König WA, Loeffler W, Müller R. Ophiocordin, an antifungal antibiotic of *Cordyceps ophioglossoides*[J]. Archives of Microbiology, 1977, 113(1/2): 121-130
- [45] Krasnoff SB, Reátegui RF, Wagenaar MM, Gloer JB, Gibson DM. Cicadapeptins I and II: new aib-containing peptides from the entomopathogenic fungus *Cordyceps heteropoda* [J]. Journal of Natural Products, 2005, 68(1): 50-55
- [46] 郝治华. 冬虫夏草区系真菌及其 SSCP 研究[D]. 拉萨: 西藏大学硕士学位论文, 2011
- Hao ZH. Research on mycoflora of aweto using SSCP approach[D]. Lasa: Master's Thesis of Tibet University, 2011 (in Chinese)
- [47] 张永杰, 孙炳达, 张姝, 旺姆, 刘杏忠, 巩文峰. 分离自冬虫夏草可培养真菌的多样性研究[J]. 菌物学报, 2010, 29(4): 518-527
- Zhang YJ, Sun BD, Zhang S, Wangmu, Liu XZ, Gong WF. Mycobiotal investigation of natural *Ophiocordyceps sinensis* based on culture-dependent investigation[J]. Mycosystema, 2010, 29(4): 518-527 (in Chinese)
- [48] Dos Santos Dias AC, Couzinet-Mossion A, Ruiz N, Lakhdar F, Etahiri S, Bertrand S, Ory L, Roussakis C, Pouchus YF, Nazih EH, et al. Steroids from marine-derived fungi: evaluation of antiproliferative and antimicrobial activities of eburicol[J]. Marine Drugs, 2019, 17(6): 372