

研究报告

## 一种寄生家蚕被毛孢的鉴定及产孢条件优化

瞿娇娇 邹晓\* 周叶鸣 韩燕峰 梁宗琦

(贵州大学 真菌资源研究所 贵州 贵阳 550025)

**摘要:**【目的】对寄生家蚕的真菌被毛孢进行鉴定和孢子培养进行研究。【方法】采用形态特征比较和内转录间隔区(ITS)序列构建系统树进行鉴定,通过单因素筛选和正交试验进行产孢条件优化。【结果】根据形态特征比较和系统发育分析,该真菌为鹿儿岛被毛孢 *Hirsutella satumaensis* Aoki。较优产孢条件为(质量体积比):蛋白胨 3%,葡萄糖 1%,蚕蛹粉 1.5%,维生素 B<sub>1</sub> 1%,硫酸镁 0.05%,磷酸二氢钾 0.1%,琼脂 2%,蒸馏水 1 000 mL, 25 °C。【结论】鹿儿岛被毛孢为已知种,文中对其显微特征进行了重新描述并补充相关分子系统学资料;产孢条件的优化可为该类群真菌孢子的获得与应用提供参考。

**关键词:** 被毛孢属, 鹿儿岛被毛孢, 家蚕, 产孢条件

## Identification of a parasitic *Hirsutella* Pat. of *Bombyx mori* Linnaeus. and sporulation conditions optimization

QU Jiao-Jiao ZOU Xiao\* ZHOU Ye-Ming HAN Yan-Feng LIANG Zong-Qi

(Institute of Fungus Resources, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

**Abstract:** [Objective] The objectives are to identify a parasitic *Hirsutella* Pat. of *Bombyx mori* Linnaeus. and to research the spore culture of this fungus. [Methods] The comparison of morphological characteristics and internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis were used for identification of specimens. Single factor test and orthogonal test were carried out for studying sporulation conditions optimization. [Results] According to the morphological characterization and phylogenetic tree, the fungus was identified as *Hirsutella satumaensis* Aoki. The optimum conditions for sporulation is: peptone 3%, glucose 1%, silkworm chrysalis powder 1.5%, vitamin B<sub>1</sub> 1%, magnesium sulfate 0.05%, potassium dihydrogen phosphate 0.1%, agar 2%, distilled water 1 000 mL, 25 °C. [Conclusion] *H. satumaensis* Aoki, a known species in China, which microscopic characteristics were described again and the associated molecular systematics data were added in this paper. The sporulation conditions optimization could provide a reference for the spores acquisition and application of this group of fungi.

**Keywords:** *Hirsutella* Pat., *Hirsutella satumaensis*, *Bombyx mori* Linnaeus., Sporulation

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30360031); 国家自然科学基金重大子项目(No. 31093440); 贵州省科技基金项目(No. 黔科合 J 字[2011]2160 号); 贵州大学引进人才项目(No. 2011-10)

\*通讯作者: ✉: coprinus@126.com

收稿日期: 2014-03-04; 接受日期: 2014-04-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-18

被毛孢属(*Hirsutella* Pat.)又称多毛孢属, Patouillard 1892 年以嗜虫被毛孢 *Hirsutella entomophila* Pat. 作为模式种建立<sup>[1]</sup>。目前该属主要形态特征为:有或无孢梗束形成,菌丝无色、淡色、深褐色;孢梗束柱状、丝状;简单或分枝;瓶梗散生于菌丝体上或着生于孢梗束外围菌丝上;瓶梗表面光滑或粗糙,颈部简单或再育成 2 个或多个小颈;颈部一般直,部分种可呈螺旋状和波浪状;分生孢子单细胞,少数双细胞,一般球形、椭圆形、梭形、橘瓣形等,单个或多个埋于无色或有色的黏液层中<sup>[2]</sup>。被毛孢的有性阶段属于线虫草属 *Ophiocordyceps* Petch.<sup>[3]</sup>,而虫草是亚洲很多国家的传统药物,使得该属真菌的活性物质研究也受到关注<sup>[4]</sup>。如被毛孢的一些药用功能及活性物质能有效抗结核杆菌、抗疟疾等<sup>[5-6]</sup>。因此,被毛孢这类真菌资源不但能在生态系统中控制节肢动物、线虫种群数量并维持系统平衡,而且在医药、生物活性物质开发方面也有重要价值<sup>[7-9]</sup>。被毛孢属真菌寄生范围包括昆虫、蜘蛛、螨类和线虫等类群,其资源种类丰富且分布范围广泛<sup>[10-13]</sup>,迄今为止,Index Fungorum 对该属已有 109 个分类单元记载(<http://www.indexfungorum.org>)。

鹿儿岛被毛孢于 1952 年在日本鹿儿岛地区的僵蚕中被分离发现,1957 年被正式命名:*Hirsutella satumaensis* Aoki<sup>[14]</sup>,寄主为家蚕,患病家蚕特征是死后虫体变得僵硬,形成僵虫,随后从虫体发出孢梗束。该菌的研究集中在昆虫侵染方面,*H. satumaensis* 侵入家蚕体表后以虫菌体的形式增殖,共分为 5 个阶段,其形态也随阶段变化而从较小的卵圆形至具隔膜的菌丝体,直至布满体腔,寄主死亡<sup>[15]</sup>。Cayrol 等<sup>[16]</sup>将其分生孢子应用于叶线虫、茎线虫和根结线虫表面的附着,结果无效,说明其寄主比较专一。该菌在中国的首次纪录是 1990 年, Bao 等报道了该菌的来源及形态学特征<sup>[17]</sup>,但原始的描述没有提供充分的信息,如菌株的再分离和重新描述、缺少相关的分子系统学资料而不能用现代生物分类学标准来进行重新描述。

基于此,本文对 *H. satumaensis* 进行了重新描述鉴定,补充了相关分子系统学资料,并对该菌分生孢子的产生进行了培养基的初步优化,为该类型真菌进一步应用或研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

PDA 培养基、查氏培养基、沙氏培养基,参照文献<sup>[18]</sup>。基础培养基(g/L):葡萄糖 10.0,蛋白胨 5.0,硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.2,磷酸二氢钾 1.0,维生素 B<sub>1</sub> 1.0,琼脂 20.0,蒸馏水 1 000 mL<sup>[19]</sup>。

### 1.2 无性阶段菌株分离与培养

标本来自贵州省清镇市蚕场,为罹病家蚕,先将标本虫体用清水冲洗干净,将虫体标本表面用 75% 的乙醇消毒 3–5 s,掰断寄主露出内部组织,用接种针挑取组织块放在无菌、含有抗生素的 PDA 平板上,挑取部位应靠近生前昆虫背部血体腔位置,在 22 °C 培养 14 d 后观察菌落特征并镜检微观形态。选取纯化的菌落编号保存,文中菌株编号为 GZUIFR-Hir201012JC。在查氏和沙氏培养基上培养用于鉴定,培养条件为:光照 12 h/黑暗 12 h, 22 °C, 20 d。

### 1.3 DNA 的提取及 ITS 序列扩增

从 PDA 平板上刮取无菌菌丝体用于 DNA 的提取,根据 Tigano-Milani 等<sup>[20]</sup>的方法提取。参照 White 等<sup>[21]</sup>的方法,以该菌基因组 DNA 为模板,选用通用引物 ITS5 (5'-GGTGAGAGATTTCTGTG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 ITS 区的 rDNA, PCR 产物送由上海 Invitrogen 公司纯化和测序。

### 1.4 基于 ITS1-5.8S-ITS2 系统发育分析

测序结果经 BioEdit 软件分析和手工校正后,提交 GenBank,登录号 KJ913066;用 NCBI 的 BLAST 程序将测出的序列与数据库中序列进行比对,选取相似度大于 85% 的序列构建系统树。选用 MEGA 5.2 软件的 Bootstrap 程序构建 ITS 序列系统进化树并进行系统发育分析<sup>[22]</sup>,条件设置为:邻接法(NJ)、重复次数(Replications)

1 000。选用的序列片段如表 1 所示，以球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 作为外群。

### 1.5 产孢条件筛选

单因子实验：在基础培养基的基础上，分别改变碳源、氮源、生长因子，每 1 000 mL 培养基中，(1) 碳源：对照组、葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、淀粉、麦片各 10 g；(2) 氮源：对照组、蛋白胨、黄豆粉、酵母浸出汁、硫酸铵、硝酸钾、麸皮各 10 g；(3) 改变添加物：对照组、马铃薯汁 200 mL、20% 稀释鲜牛奶 200 mL、土壤浸出液 200 mL、蚕蛹粉浸出液 200 mL<sup>[19]</sup>。接种活化后的 *H. satumaesis* (菌块大小为 1.5 mm×1.5 mm×0.5 mm)，封口膜封住培养皿，放入光照培养箱中，培养温度为 22 °C，每组 3 个对照，重复 3 次。20 d 后取 7.0 cm<sup>2</sup> 菌块水洗孢子并计数。

正交实验：选定最佳碳源、氮源，添加物和培养温度作为考察因素，每个因素各取 3 个水平，采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行正交试验，获得最优配比及培养基条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 鹿儿岛被毛孢 已知种 图 1

*Hirsutella satumaensis* Aoki, Nakasato, Fujimoto & Suzuki, Bull. seric. Exp. Stn. Japan 14(10) :

486(1957)。Figure 1。

寄主昆虫长约 5 cm，菌丝覆盖虫体表面，菌丝褐色，毡状。孢梗束从虫体各处发出，直立不分枝，长(3.0–6.5) mm×宽 0.5 mm，褐色，尖部颜色变浅。在 22–24 °C 光照下，PDA 培养基中 40 d 后能产生孢梗束，60 d 后孢梗束长约 4.0–5.0 cm，有趋光性；菌落在查氏培养基上生长缓慢，25 °C、20 d 菌落直径 2.0–3.2 cm，绒毛状，灰白色，背面分泌褐色色素；菌丝透明，有隔，壁光滑，有少量分枝，宽 3.0–5.6 μm；产孢细胞直立与菌丝成直角，基部具疣，柱状膨大(6.0–8.5) μm×(2.5–3.0) μm，顶端突然变细呈螺旋状弯曲(8.0–9.0) μm×0.8 μm。分生孢子单生无隔，无色，光滑，船形或橘瓣状，具黏液，(6.0–7.0) μm×(2.7–3.0) μm。

研究标本：GZUIFR-Hir201012JC，梁建东，2010 年 12 月，罹病家蚕，标本来自贵州省清镇市蚕场。现保存于贵州大学真菌资源研究所。

寄主：家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus.，5 龄幼虫。

分布：中国贵州、浙江，日本等地。

图 2 中明显有两个分支，图示 A 分支包含了一个独立的亚进化支，是由 *H. satumaesis*、*H. nodulosa*、*H. aphidis*、*H. vermicola* 和 *H. liboensis* 组成的；同时线性虫草属 *Ophiocordyceps* Petch. 的几个

表 1 构建系统树所用序列及其 GenBank 登录号			
Table 1 List of GenBank accession numbers used for construct phylogenetic tree			
名称	GenBank 登录号	名称	GenBank 登录号
Name	GenBank accession No.	Name	GenBank accession No.
<i>Hirsutella nodulosa</i>	EF194146	<i>Ophiocordyceps cochliidiicola</i>	AB027377
<i>Hirsutella aphidis</i>	EF194156	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	EU570957
<i>Hirsutella tunicata</i>	JN247824	<i>Ophiocordyceps</i> cf. <i>acicularis</i>	GU723765
<i>Hirsutella liboensis</i>	FJ957892	<i>Ophiocordyceps acicularis</i>	JN049820
<i>Hirsutella vermicola</i>	DQ345592	<i>O. rubiginosiperitheciata</i>	AB294423
<i>Hirsutella rhossiliensis</i>	DQ345566	<i>Ophiocordyceps cochliidiicola</i>	AB031196
<i>Elaphocordyceps inegoensis</i>	AB027368	<i>Cordyceps sinensis</i>	AB067713
<i>Elaphocordyceps paradoxa</i>	AB027369	<i>Cordyceps multiaxialis</i>	AJ309359
<i>Elaphocordyceps capitata</i>	AB027364	<i>Cordyceps capitata</i>	EF530933
<i>Elaphocordyceps capitata</i>	AB208110	GZUIFR-Hir201012JC	KJ913066
<i>Beauveria bassiana</i>	AF293968		

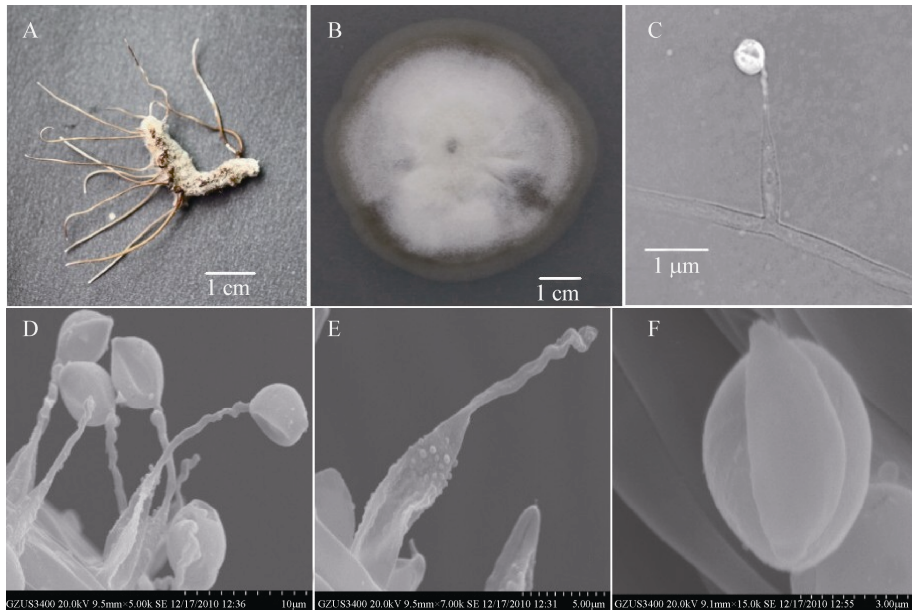


图 1 *Hirsutella satumaensis* 的菌落形态，产孢细胞结构图

Figure 1 Colony, synnemata, phialides structures of *H. satumaensis*

注：A：家蚕上的孢梗束；B：PDA 上 20 d 后形成的菌落表面；C、D：产孢结构；E：瓶梗；F：分生孢子。

Note: A: Synnemata on *Bombyx mori* Linnaeus.; B: Culture on PDA media for 20 days; C, D: The phialides structure on Hyphae; E: Phialides without helixes; F: Conidia.

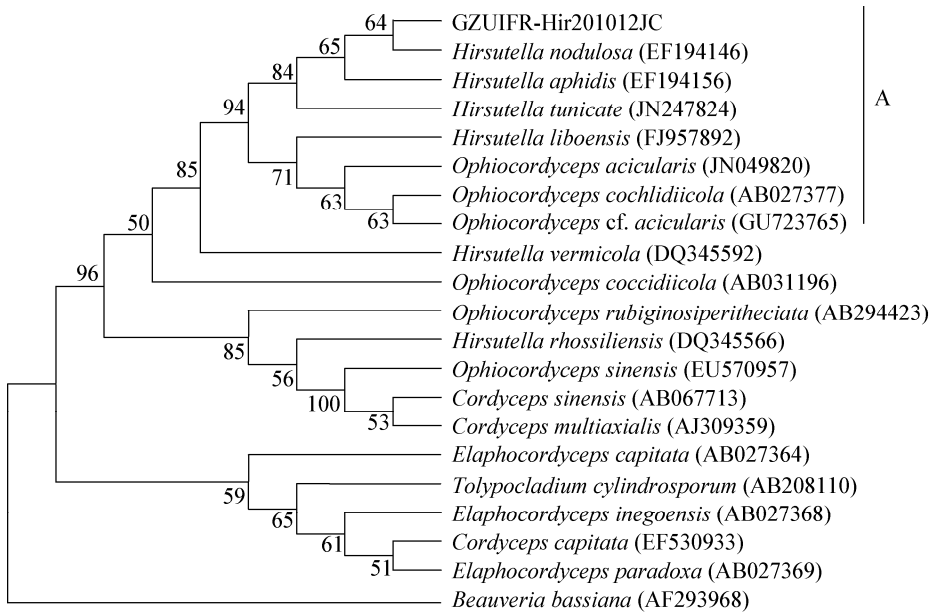


图 2 基于 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 序列对 *H. satumaensis* 及一些相关种构建的进化树

Figure 2 Phylogenetic tree based on analysis of rDNA ITS1-5.8S-ITS2 sequences of *H. satumaensis* and some related species

注：A：包含螺旋瓶颈几个特殊种的亚分支。

Note: A: The sub-branch containing several special kinds of species with helical twists of the necks.

种也包含在此类，这与被毛孢的有性阶段属于线虫草属相联系。在被毛孢属中有 8 个种是螺旋或弯曲的瓶颈，*H. satumaensis* 被聚集到了这一类，但它们之间形态上也有差异，如表 2 所示。*H. vermicola* 感染线虫，有一对生的瓶梗，分生孢子近梭形或椭圆形；而 *H. nodulosa* 的瓶梗下部具疣，颈部可再育，长/宽比例更大，寄生螨；*H. aphidis* 孢梗束很短，疣状，瓶梗狭锥形，(17.0–90.0)  $\mu\text{m}\times(2.6\text{--}4.0)\text{ }\mu\text{m}$ ，分生孢子船形或近圆形；*H. satumaensis* 孢梗束长度适中，孢子船形或橘瓣状。综上，确定该菌株为：

鹿儿岛被毛孢 *Hirsutella satumaensis* Aoki。

2.2 产孢条件筛选

2.2.1 不同碳源筛选：由表 3 可知，不同碳源对 *Hirsutella satumaensis* 的产孢量影响不一样，经 SPSS 单因素方差检验，碳源以葡萄糖为最佳，其单位面积内孢子量最大， $7.967\times10^6$  个/mL，从大到小依次是：葡萄糖>麦片>乳糖>蔗糖>麦芽糖>淀粉；其中葡萄糖与其他各糖的差异均显著 ( $P<0.05$ )。由此可以得出，单糖更容易被吸收，其次是双糖，而多糖则不易被吸收。

表 2 鹿儿岛被毛孢及其近缘种之间的形态差异 Table 2 Morphological comparison between <i>Hirsutella satumaensis</i> and its similar species				
名称 Name	瓶梗 Phialides	分生孢子 Conidia	寄主 Host	孢梗束 Synnemata
<i>H. brownorum</i>	非聚生	柠檬状，(5–6) $\mu\text{m}\times(4\text{--}5)\text{ }\mu\text{m}$	螨	无
<i>H. dendritica</i>	颈部弯曲	梭形，无黏液，(6–8) $\mu\text{m}\times(2\text{--}3)\text{ }\mu\text{m}$	鳞翅目蛹	单生
<i>H. leizhouensis</i>	具疣瘤，对生	卵形，无黏液，(3.5–4.5) $\mu\text{m}\times(2.0\text{--}3.0)\text{ }\mu\text{m}$	蔗褐蠹蛾	群生
<i>H. liboensis</i>	单生，光滑，聚生	梭形，具黏液鞘，(6.0–10.0) $\mu\text{m}\times(1.5\text{--}4.0)\text{ }\mu\text{m}$	木蠹蛾	群生
<i>H. parasitica</i>	瓶颈弯曲	圆柱状，无黏液，(12.0–25.0) $\mu\text{m}\times(2.5\text{--}4.0)\text{ }\mu\text{m}$	未知	群生
<i>H. vermicola</i>	单生或对生	椭圆形或橘瓣状，(7.0–8.0) $\mu\text{m}\times(1.5\text{--}3.0)\text{ }\mu\text{m}$	线虫	无
<i>H. satumaensis</i>	单生，具疣瘤	船形或橘瓣状，(6.0–7.0) $\mu\text{m}\times(2.7\text{--}3.0)\text{ }\mu\text{m}$	家蚕	群生
<i>H. nodulosa</i>	具疣瘤	无黏液，(3–5) $\mu\text{m}\times3\text{ }\mu\text{m}$	螨	无

表 3 不同碳源对 <i>H. satumaensis</i> 产孢量的影响 Table 3 The effect of different carbon sources on sporulation of <i>H. satumaensis</i>		
编号 Number	碳源 Carbon sources	产孢量( $10^6$ 个/mL) Sporulation ( $10^6$ spores/mL)
1	葡萄糖	7.967±0.709 a
2	麦片	3.800±1.609 b
3	乳糖	2.300±1.706 bc
4	蔗糖	1.667±0.379 c
5	麦芽糖	1.400±0.529 cd
6	淀粉	0.367±0.058 d

注：表中数据为均值，同一列数据中右下角标识不同字母的数据表示与其他数据差异显著 ( $P<0.05$ )，下同。  
Note: The data in the table is the mean and the data in the same column with different letters in the lower right corner show significant differences with others ( $P<0.05$ ), the same below.

**2.2.2 不同氮源筛选：**由表 4 可知，经 SPSS 单因素方差检验，产孢量最高的氮源是蛋白胨， $10.4\times10^6$  个/mL，其中蛋白胨与其他各氮源的差异均显著( $P<0.05$ )。6 种氮源来自动物、植物、微生物及无机氮源，由于 *H. satumaensis* 的寄主为昆虫，其体内酶系统更有利于利用动物性氮源，因此蛋白胨对产孢效果更好，无机氮源利用效率相对最低。

**2.2.3 不同添加因子筛选：**由表 5 可知，经 SPSS 单因素方差检验，产孢量最高的添加因子是蚕蛹粉， $8.767\times10^6$  个/mL，其次是马铃薯和土壤，其中蚕蛹粉与其他各添加因子的差异均显著( $P<0.05$ )。其原因是这几种添加物分别提供的是昆虫源生长因子、植物源生长因子和腐生源生长因子，蚕蛹粉更加符合自然条件下 *H. satumaensis* 的营养需求，因此更有利于其生长及分生孢子的产生。

**2.2.4 正交试验：**根据单因素实验的结果，选取影响 *H. satumaensis* 产孢量的各因素中有意义的水平进行正交试验，以确定最佳配比。采用  $L_9(3^4)$  正交表，以蛋白胨(A)、葡萄糖(B)、蚕蛹粉(C)、温度(D)作为 4 个考察因素，选取 3 个水平进行实验。按表 6 的正交因素水平设计  $L_9(3^4)$  正交试验，结果见表 7。

以单位面积产孢量为指标进行直观分析(表 7)和方差分析(表 8)，影响 *H. satumaensis* 产孢量的因素顺序为  $A>B>C=D$ ，即蚕蛹粉>温度>葡萄糖=蛋白胨；结合单因素筛选结论，最佳配比为  $A_3B_1C_3D_3$ ，即最适配比和培养条件为(质量体积比)：蛋白胨 3%，葡萄糖 1%，蚕蛹粉 1.5%，维生素  $B_1$  1%，硫酸镁 0.05%，磷酸二氢钾 0.1%，琼脂 2%，蒸馏水 1 000 mL，25 °C。方差分析结果表明 4 个因素中蚕蛹粉对单位产孢量有显著性影响。

表 4 不同氮源对 <i>H. satumaensis</i> 产孢量的影响		
Table 4 The effect of different nitrogen sources on sporulation of <i>H. satumaensis</i>		
编号 Number	氮源 Nitrogen sources	产孢量( $10^6$ 个/mL) Sporulation ( $10^6$ spores/mL)
1	蛋白胨	10.400±4.355a
2	黄豆粉	5.033±1.101b
3	麸皮	2.967±0.493bc
4	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.933±0.208c
5	KNO <sub>3</sub>	0.567±0.153c
6	酵母浸出汁	0.533±0.153c

表 5 不同添加因子对 <i>H. satumaensis</i> 产孢量的影响		
Table 5 The effect of different adding factors on sporulation of <i>H. satumaensis</i>		
编号 Number	添加因子 Addition factor	产孢量( $10^6$ 个/mL) Sporulation ( $10^6$ spores/mL)
1	蚕蛹粉	8.767±1.258a
2	马铃薯	3.733±0.850b
3	土壤	3.667±0.666b
4	牛奶	1.477±0.721b

表 6 影响 *H. satumaensis* 产孢量  $L_9(3^4)$  正交试验因素水平表  
Table 6 Factors and levels for  $L_9(3^4)$  orthogonal array design on influence spore production quantity of *H. satumaensis*

水平 Level	因素 Factors			
	A 蛋白胨	B 葡萄糖	C 蚕蛹粉	D 温度
	A Peptone (%)	B Glucose (%)	C Silkworm pupa powder (%)	D Temperature (°C)
1	1	1	0.5	15
2	2	2	1.0	20
3	3	3	1.5	25

表 7 正交试验结果  
Table 7 Orthogonal test results

序号 Number	A 蛋白胨 A Peptone (%)	B 葡萄糖 B Glucose (%)	C 蚕蛹粉 C Silkworm pupa powder (%)	D 温度 D Temperature (°C)	产孢量( $10^6$ 个/mL) Sporulation ( $10^6$ spores/mL)			均值 Mean value
					1	2	3	
1	3	2	1.5	15	12.50	10.00	20.00	14.167
2	3	3	0.5	20	5.00	7.50	2.50	5.000
3	2	1	1.5	20	17.50	15.00	10.00	14.167
4	2	3	1.0	15	5.00	5.00	10.00	6.667
5	2	2	0.5	25	7.50	7.50	5.00	6.667
6	1	3	1.5	25	17.50	12.50	10.00	13.333
7	1	1	0.5	15	5.00	2.50	5.00	4.167
8	3	1	1.0	25	10.00	20.00	5.00	11.667
9	1	2	1.0	20	7.50	10.00	7.50	8.333
$k_1$	8.611	10.000	5.278	8.333				
$k_2$	9.167	9.722	8.889	9.167				
$k_3$	10.278	8.333	13.889	10.556				
$R$	1.667	1.667	8.661	2.223				

表 8 方差分析  
Table 8 Analysis of variance

方差来源 Source of variation	离均差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	方差 Variance	$F$ 值 $F$	显著性 Significance
A	12.963	2	6.481	0.431	**
B	14.352	2	7.176	0.477	
C	336.574	2	168.287	11.185	
D	22.685	2	11.343	0.754	
误差 Error	270.833	18			

### 3 讨论

具有弯曲或螺旋瓶梗的被毛孢是被毛孢属中较为特殊的一个类群, 目前为止有包括 *H. satumaensis* 在内的 8 个种, 其形态学意义可能在于更有利于孢子的弹射及传播。除此之外, 鹿儿岛被毛孢分生孢子表面还具有黏液层, 这有利于其在寄主表面的黏附, 其黏液组成及功能尚不清楚, 有待进一步研究探索。针对 *H. satumaensis* 生长缓慢、产孢量小的特性而进行的碳源、氮源、生长因子及正交试验表明: 氮源/碳源为 3 时, 寄主源的生长因子更有利于其产孢; 温度对产孢量的影响不显著, 25 °C 下能有较大的产孢量, 这比该菌的正常生长温度偏高, 可能原因是由于在实验室条件下被驯化的结果, 使得该菌能耐受较高的温度。本文结果较为符合该菌在自然条件下的生长特性, 筛选的氮源、碳源、生长因子及最佳浓度配比都为该菌进一步的分生孢子的研究提供基础。

### 参 考 文 献

- [1] Patouillard N. Une Clavariée entomogène[J]. Revue Mycologique Toulouse, 1892: 67-70.
- [2] 梁宗琦. 被毛孢属的分类研究 进展及分类特征[J]. 贵州农学院学报, 1990, 9(1): 58-68.
- [3] 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.
- [4] 梁宗琦, 韩燕峰, 梁建东, 等. 冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 研究中几个值得关注的问题[J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1692-1697.
- [5] Isaka M, Hywel-jones NL, Somrithipol S, et al. Novel antituberculosis compounds, *Hirsutellones* A, B, and C: US 2006122252 A1[P]. 2006-06-08.
- [6] Thongtan J, Saenboonrueng J, Rachtaewee P, et al. An antimalarial tetrapeptide from the entomopathogenic fungus *Hirsutella* sp. BCC 1528[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(4): 713-714.
- [7] 何亚琼, 胡丰林, 左登平, 等. 一种被毛孢中天然色素的提取分离和结构鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(11): 121-124.
- [8] 何亚琼, 胡丰林, 李春如, 等. 40株虫生真菌菌丝体提取物抗肿瘤活性的初步研究[J]. 安徽农业大学学报, 2008, 35(1): 84-88.
- [9] 寿旗扬, 傅惠英, 陈方明, 等. 中国被毛孢发酵物对 NOD 小鼠 型糖尿病的预防作用[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1311-1315.
- [10] Toledo AV, Humber RA, Lastra CC. First and southernmost records of *Hirsutella* (Ascomycota: Hypocreales) and *Pandora* (Zygomycota: Entomophthorales) species infecting Dermaptera and Psocodea[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 97(2): 193-196.
- [11] Kurihara Y, Shirouzu T, Tokumasu S, et al. *Hirsutella proturicola* sp. nov. isolated from a proturan, *Baculentulus densus*[J]. The Mycological Society of Japan and Springer, 2009, 50(1): 56-62.
- [12] Zou X, Liu AY, Liang, ZQ, et al. *Hirsutella liboensis*, a new entomopathogenic species affecting *Cossidae* (Lepidoptera) in China[J]. Mycotaxon, 2010, 111(6): 39-44.
- [13] 方焕谋, 谭树明. 多毛孢属一个新种——雷州多毛孢[J]. 真菌学报, 1992, 11(1): 28-31.
- [14] Aoki K, Nakasato Y, Fujimoto I, et al. Studies on the new fungous parasites of silkworms, *Bombyx mori* L. IV. *Hirsutella satumaensis* Aoki sp. nov.[J]. Bulletin of the Sericultural Experiment Station (Suginami-ku, Tokyo), 1957, 14: 471-486.
- [15] Kiyoshi K. Studies on the Hyphal bodies (cylindrical spores) of muscardines . On the Hyphal bodies of an entomogenous fungus, *Hirsutella satumaensis* Aoki[J]. Bulletin of the Sericultural Experiment Station (Suginami-ku, Tokyo), 1965, 20(1): 37-56.
- [16] Cayrol JC, Castet R, Samson RA. Comparative activity of different *Hirsutella* species towards three plant parasitic nematodes[J]. Revue de Nématologie, 1986, 9(4): 412-414.
- [17] Bao JR, Chen HK, Wang GC. Studies on *Hirsutella necatrix* and *H. satumaensis* newly occurring in Zhejiang Province[J]. Acta Agriculturae Universitatis Zhejiangensis, 1990, 1: 10-13.
- [18] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 241-243.
- [19] 王灿. 中国被毛孢固体和液体培养中生长特性的研究[D]. 兰州: 兰州交通大学硕士学位论文, 2012.
- [20] Tigano-Milani MS, Samson RA, Martins I, et al. DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*[J]. Microbiology, 1995, 141: 239-245.
- [21] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[C]//Innis MA, Gelfand HD, Sninsky JJ, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M], 1990: 315-322.
- [22] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.