

## 研究报告

# 昆明西山森林公园天然虫生真菌及其内生真菌的分离鉴定及多样性分析

许小蓉<sup>1</sup>, 黄之镨<sup>1</sup>, 许玉潇<sup>1</sup>, 张科涛<sup>1</sup>, 庾呈杰<sup>1</sup>, 张冰<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 云南省中医药学分子生物学重点实验室, 云南 昆明 650500

许小蓉, 黄之镨, 许玉潇, 张科涛, 庾呈杰, 张冰, 刘朝金, 赵庆, 张晓梅. 昆明西山森林公园天然虫生真菌及其内生真菌的分离鉴定及多样性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 64-77.

XU Xiaorong, HUANG Zhipu, XU Yuxiao, ZHANG Ketao, TUO Chengjie, ZHANG Bing, LIU Chaojin, ZHAO Qing, ZHANG Xiaomei. Isolation, identification, and diversity analysis of natural entomogenous fungi and endophytic fungi in Xishan Forest Park of Kunming[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 64-77.

**摘要:**【背景】不同地区虫草物种多样性的调查是虫草相关研究的热点之一, 虫草真菌区系研究是真菌资源研究的重要内容。【目的】了解云南省昆明市西山森林公园天然虫生真菌及其内生真菌的多样性, 增加对虫草真菌区系的认识。【方法】对该地区通过资源调查并采用组织分离法对采集的虫草样本进行虫生真菌及其内生真菌的分离, 利用形态特征观察及 ITS 联合 nrSSU、nrLSU、translation elongation factor-1 $\alpha$  (*tef-1 $\alpha$* )、*rpb1*、*rpb2* 多基因测序进行虫生真菌物种鉴定及多样性分析。【结果】共采集 45 份云南省昆明市西山森林公园天然虫草样本, 鉴定结果表明隶属于 2 科 5 属 12 种, 包括虫草科(*Cordycipitaceae*)的鳞翅虫草属(*Samsoniella*) (2 种, 含疑似新种 1 个)、虫草属(*Cordyceps*) (4 种)和白僵菌属(*Beauveria*) (4 种), 以及线虫草科(*Ophiocordycipitaceae*)的紫枝孢属(*Purpureocillium*) (1 种)和弯颈霉属(*Tolyposcladium*) (1 种, 为疑似新种), 优势属为虫草属(*Cordyceps*), 优势种为环链虫草(*Cordyceps cateniannulata*) (生态优势度=0.241 380)。同时, 从采集的虫草样本中分离鉴定得到 67 株隶属于 13 科 14 属的内生真菌, 其中, 木霉属(*Trichoderma*) (28%) 和镰刀菌属(*Fusarium*) (19%) 为此次分离鉴定得到的优势菌属。【结论】本研究补充了西山森林公园虫草生物多样性资源数据库, 有利于云南虫草生物多样性资源的保护和利用, 同时对虫草真菌区系的系统研究也加深了我们对虫草真菌区系的认识。

**关键词:** 西山森林公园; 虫生真菌; 内生真菌; 纯培养分离; 物种多样性

资助项目: 国家自然科学基金(31960001); 云南省万人计划“青年拔尖人才”专项(YNWR-QNBJ-2019-161)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31960001) and the Top Young Talents of Ten Thousand Program in Yunnan Province (YNWR-QNBJ-2019-161).

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

Received: 2022-04-26; Accepted: 2022-06-27; Published online: 2022-07-14

# Isolation, identification, and diversity analysis of natural entomogenous fungi and endophytic fungi in Xishan Forest Park of Kunming

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

1 College of Basic Medicine, College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Yunnan Key Laboratory of Molecular Biology for Sinomedicine, Kunming 650500, Yunnan, China

**Abstract: [Background]** The investigation of *Cordyceps* species diversity in different areas is one of the hotspots of *Cordyceps*-related research, and the study on *Cordyceps*-related fungi flora is an important content of fungus resources research. **[Objective]** To investigate the diversity of natural entomogenous fungi and endophytic fungi in Xishan Forest Park of Kunming in Yunnan, and increase the understanding of *Cordyceps*-related fungi flora. **[Methods]** The resources of *Cordyceps* species were investigated, and the tissue separation method was used to isolate entomogenous fungi and endophytic fungi from the samples of *Cordyceps* species. Morphological observation and multi-gene sequencing of ITS combined with nrSSU, nrLSU, translation elongation factor-1 $\alpha$  (*tef-1 $\alpha$* ), *rpb1*, and *rpb2* were used to identify the entomogenic fungi of *Cordyceps* species and analyze their diversity. **[Results]** Forty-five natural samples of *Cordyceps* species were collected from Xishan Forest Park of Kunming, which belonged to 12 species, 5 genera, and 2 families, including 2 *Samsoniella* sp. with 1 potential new species, 4 *Cordyceps* sp., and 4 *Beauveria* sp. in *Cordycipitaceae*, and 1 *Purpureocillium* sp., and 1 *Tolypocladium* sp. (potential new species) in *Ophiocordycipitaceae*. The dominant genus was *Cordyceps*, and the dominant species was *Cordyceps cateniannulata* (ecological dominance=0.241 380). Meanwhile, 67 strains of endophytic fungi in 14 genera of 13 families were isolated from the samples, among which *Trichoderma* (28%) and *Fusarium* (19%) were the dominant genera. **[Conclusion]** This study supplements the resource database of *Cordyceps* biodiversity in Xishan Forest Park of Kunming, which is conducive to the protection and utilization of *Cordyceps* biodiversity resources in Yunnan. At the same time, this systematic study also deepens the understanding of *Cordyceps*-related fungi flora.

**Keywords:** Xishan Forest Park in Kunming; entomogenous fungi; endophytic fungi; isolation of pure culture; species diversity

虫草是指寄生于无脊椎动物、少数真菌和植物上的肉座菌目(*Hypocreales*)真菌,这类真菌富含的多种生物活性物质具有抗菌、抗虫、抗肿瘤和提高机体免疫力的作用,对人类健康和生态系统稳定具有重要意义,具有极高的药

用价值和经济价值<sup>[1-2]</sup>。根据虫草分类系统,虫草隶属于麦角菌科(*Clavicipitaceae*)、虫草科(*Cordycipitaceae*)和线虫草科(*Ophiocordycipitaceae*)及其他分类地位未定的类群<sup>[3]</sup>。在菌物名录数据库 MycoBank (<http://www.MycoBank.org>)和

Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>) 中可检索到 1 300 余个虫草分类单元(截至 2020 年 3 月), 但我国报道的有效名称不足 200 个<sup>[4]</sup>。因此, 一直以来针对不同地区虫草物种多样性的调查研究也是虫草相关研究的热点之一。在虫草及其微生境群落中, 除虫生真菌外, 还分布有其他与虫生真菌共生的真菌类群, 这些真菌类群, 一方面在虫草的种群分化、环境适宜性、感染机制和活性代谢物质量方面发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>, 如研究显示冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*)群落中的一些微生物物种与冬虫夏草密切相关, 而且可能参与了其子实体的发育<sup>[7-8]</sup>。另一方面, 这些与虫草共生的真菌类群在与宿主的长期协同进化过程中具有能够产生某些与虫生真菌类似的活性代谢产物, 如分离自冬虫夏草上的新菌种蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepiali*)和蝙蝠蛾被孢霉(*Mortierella hepiali*)已分别被制成金水宝胶囊和至灵胶囊<sup>[9-10]</sup>; Min 等<sup>[11]</sup>从冬虫夏草中分离到的淡色生赤壳菌(*Bionectria ochroleuca*)具有产虫草素的能力。此外, 亚香棒虫草(*Cordyceps hawkesii*)中存在可促产优质虫草多糖的内生真菌 C-10<sup>[12]</sup>。由此可见, 虫草微生物群落中可能具有很多重要的与虫草相关的真菌资源有待认识和开发利用, 同时, 加强虫草物种及其相关真菌群落的物种多样性研究可以更好地了解群落内部种群关系, 从而获得群落的动态和功能。因此, 针对虫草群落中相关真菌物种多样性的系统研究也同样重要。

云南省昆明市西山森林公园地处 E102°37′-102°38′, N24°57′-24°59′, 位于滇池西岸, 面积约 12 km<sup>2</sup>, 最高海拔 2 359 m, 年平均气温在 10-22 °C 之间, 年平均降水量 1 094.1 mm, 年均相对湿度 74%<sup>[13]</sup>。此外, 目前西山森林公园保存有亚热带常绿阔叶林、针阔混交林、针叶

林、竹林、灌丛和草丛等 6 个植被类型, 由于西山森林公园保存了许多接近天然的植被类型, 因而成为滇中地区天然植被的一个缩影<sup>[14]</sup>。基于西山森林公园适宜的气候特征和独特的地理环境, 使得该地区成为研究探讨虫草生物多样性的良好场所。在前期研究中, 范琪<sup>[15]</sup>已做了关于昆明市西山森林公园虫草物种多样性的调查研究, 但未见关于该地区虫草真菌区系的报道。本研究于 2021 年 9 月对昆明西山森林公园进行野外调查, 对采集到的虫草样本利用组织分离法和形态学结合基因系统发育分析的方法对该地区虫生真菌及虫草内生真菌进行分离鉴定, 基于  $\alpha$  多样性揭示虫生真菌的物种多样性, 以期进一步考察昆明市西山森林公园虫生真菌及其内生真菌资源的物种组成, 为虫草资源的保护和可持续利用提供参考依据。同时, 期望研究结果能够增加我们对虫草群落中相关真菌物种多样性的认识, 并为研究这些真菌在虫草形成过程中的作用及其开发利用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样本采集

虫草样本于 2021 年 9 月采自云南省昆明市西山森林公园自然地貌内植被覆盖良好、环境湿度适中、透光性较好的地带, 共采集到 45 份虫草样本。根据宏观形态特征及采集地对样本进行归类 and 编号, 包括编号为“XY”的虫草样本 5 份, 编号为“XW”的虫草样本 5 份, 编号为“XS”的虫草样本 20 份, 编号为“XB”的虫草样本 13 份, 编号为“BG”的虫草样本 2 份。所采集的虫草样本用无菌滤纸包好, 放入灭菌的收集管和密封袋中进行保鲜, 放置 4 °C 冰箱内保存。

### 1.1.2 培养基

实验所用培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基<sup>[16]</sup>。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株的分离和保藏

新鲜虫草样本用无菌水洗涤以除去表面杂质后, 按以下步骤进行表面消毒: 75%酒精浸泡 1–2 min, 30%过氧化氢溶液浸泡 1–2 min, 再以无菌水反复冲洗 2–3 次, 用无菌滤纸吸干表面水分, 放置无菌培养皿中备用, 最后一次洗涤的无菌水取 200  $\mu$ L 涂布分离培养基, 25  $^{\circ}$ C 培养 1–2 周无菌落生长则说明表面消毒成功<sup>[17]</sup>。根据野生虫草形态的不同, 编号为“XY”和“XW”的虫草样本子座肉质且菌核生长状态良好, 采取组织分离法用无菌手术刀取菌核内部 5 mm 大小的组织接种至含 50 mg/L 萘啶酮酸钠的 PDA 培养基中; 编号为“XS”“XB”“BG”的虫草样本表面有大量孢子。虫生真菌可直接取野生材料表面的孢子粉“Z”字形画线接种至分离培养基上培养分离, 内生真菌的分离是取其经表面消毒的菌核内部组织接种, 于 25  $^{\circ}$ C 恒温培养。待组织边缘长出真菌菌落, 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  $^{\circ}$ C 恒温培养纯化并去重复, 将纯化所得

菌株每株接种 10 支至 PDA 斜面, 4  $^{\circ}$ C 保存, 详细记录每株菌的分离源及其在 PDA 培养基中的形态、颜色和长势等信息, 从而建立云南西山森林公园虫草及其内生真菌菌种库。

### 1.2.2 菌株的鉴定

虫草物种采用形态特征观察和 internal transcribed spacer (ITS) 结合 nrSSU、nrLSU、translation elongation factor-1 $\alpha$  (*tef-1 $\alpha$* )、*rpb1*、*rpb2* 基因系统发育分析的方法进行虫草物种的鉴定。形态学观察<sup>[18]</sup>包括宏观结构观察和微观结构观察, DNA 的提取及 PCR 扩增参考文献<sup>[19]</sup>, 所用引物见表 1。对于所分离得到的虫草内生真菌主要基于菌落形态观察及 ITS 基因系统发育分析进行鉴定, DNA 提取以及序列扩增参考侯晓强等<sup>[20]</sup>的方法。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖胶进行电泳检测, 将条带明亮且无杂带的样品送至擎科生物科技(上海)有限公司进行测序。根据测序结果, 所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 下载相似性较高的同源序列, 用 MEGA-X<sup>[21]</sup>软件基于 EF-1 $\alpha$  基因序列进行虫生真菌系统发育分析, 基于 ITS 基因序列比对并构建虫草内生真菌的系统发育树(最大似然树), 以确定物种分类地位。

表 1 文中所用引物

Table 1 Primers used in this paper

Gene	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Length (bp)
nrSSU	nrSSU-CoF	TCTCAAAGATTAAGCCATGC	1 800
	nrSSU-CoR	TCACCAACGGAGACCTTG	
nrLSU	LR5	ATCCTGAGGGAAACTTC	900–1 200
	LR0R	GTACCCGCTGAACTTAAGC	
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	600
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>tef-1<math>\alpha</math></i>	EF1 $\alpha$ -EF	GCTCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	900–1 200
	EF1 $\alpha$ -ER	ATGACACCRACRGCRCRGTGTG	
<i>rpb1</i>	RPB1-5'F	CAYCCWGGYTTYATCAAGAA	900–1 200
	RPB1-5'R	CCNGCDATNTCRTTRTCCATRTA	
<i>rpb2</i>	RPB2-5'F	CCCATRGCTTGTYRCCCAT	900–1 200
	RPB2-5'R	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	

### 1.2.3 物种多样性分析

物种多样性分析基于  $\alpha$  多样性分析研究样地虫生真菌的数量特征、物种丰富度指数和生态优势度指数,用 Excel 软件进行统计分析<sup>[22]</sup>。

$$\text{生态优势度: } C = \frac{N_i(N_i - 1)}{N(N - 1)}$$

式中:  $N_i$  为某物种个体数;  $N$  为所有物种个体数量总和。

## 2 结果与分析

### 2.1 西山森林公园虫生真菌物种多样性

从昆明市西山森林公园共采集到 45 份天然虫草样本,经分离鉴定得到 30 株虫生真菌,结合《真菌鉴定手册》<sup>[23]</sup>中相关真菌的分类检索表,利用形态特征观察(图 1)结合 EF-1 $\alpha$  基因系统发育分析(图 2)鉴定出该地区虫生真菌分属于 2 科 5 属 12 种(表 2),包括虫草科(Cordycipitaceae)的冠鳞翅虫草(*Samsoniella cristata*)、茧生虫草(*Cordyceps cocoonihabita*)、环链虫草(*Cordyceps cateniannulata*)和细脚虫草(*Cordyceps tenuipes*),以及 *Cordyceps lepidopterorum*、拟球孢白僵(*Beauveria pseudobassiana*)、球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)、*Beauveria asiatica*、*Beauveria varroae* 和线虫草科(*Ophiocordycipitaceae*)的淡紫紫孢菌(*Purpureocillium lilacinum*);此外,还有 2 种为疑似新物种,分属于鳞翅虫草属(*Samsoniella*)和弯颈霉属(*Tolypocladium*) (表 2)。同时,基于物种丰富度指数、生态优势度指数对昆明市西山森林公园采集到的虫草物种进行多样性分析显示,昆明市西山森林公园虫草物种多样性较高,优势种属现象明显,优势科为虫草科,优势属为虫草属,其检出菌株数占虫生真菌菌株总数的 74% (图 3),优势种为环链虫草(生态优势度=0.241 380) (表 2)。虫草寄主涉及鳞翅目、鞘翅目和膜翅目等动物,

其中以鳞翅目为主。

### 2.2 西山森林公园虫草内生真菌的多样性

利用形态特征观察(图 4)和构建 ITS 基因系统发育树(图 5)分析显示分离鉴定得到 67 株虫草内生真菌,分属于 13 科 14 属,包括毛霉属(*Mucor*)、木霉属(*Trichoderma*)、青霉属(*Penicillium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、盘菌属(*Peziza*)、曲霉属(*Aspergillus*)、鬼伞属(*Coprinellus*)、间座壳属(*Diaporthe*)、被孢霉属(*Mortierella*)、螺旋聚孢霉属(*Clonostachys*)、黑团孢霉属(*Periconia*)、*Psathyrella*、节菱孢霉属(*Arthrinium*)和丛赤壳属(*Nectria*)。其中,木霉属(28%)和镰刀菌属(19%)为此次研究中的优势菌属(表 3)。

## 3 讨论

### 3.1 昆明市西山森林公园虫生真菌物种丰富多样

本研究共采集 45 份虫草样本,鉴定出 12 种虫生真菌,含 2 个潜在新物种,结果表明,昆明市西山森林公园中蕴藏着丰富的虫生真菌类群,其物种多样性较高。本次调查的采样范围依据西山森林公园地貌从南向北进行,涉及未被人类活动干扰的样地及已被开发的自然保护区样地,以便详细探寻西山森林公园的虫生真菌物种的丰富度及多样性。昆明市西山森林公园里人类活动频繁,但主要集中于几条观光线路、山间石阶、已开发的景点(三清阁、太华寺、华亭寺、龙门等名胜)。此外,昆明市西山森林公园山中山势陡峭,除罗汉崖外均为繁茂的原始次生林<sup>[24]</sup>,因此,山中茂密的植被覆盖区域很少有人涉足,加之观光公众环保意识强烈,以及本区植物受到当地政府较好的保护,植被接近自然状态,森林生态系统多样、生物物种趋于稳定、生态结构复杂、昆虫种类繁多,有利于虫生真菌维持物种多样性<sup>[25]</sup>。

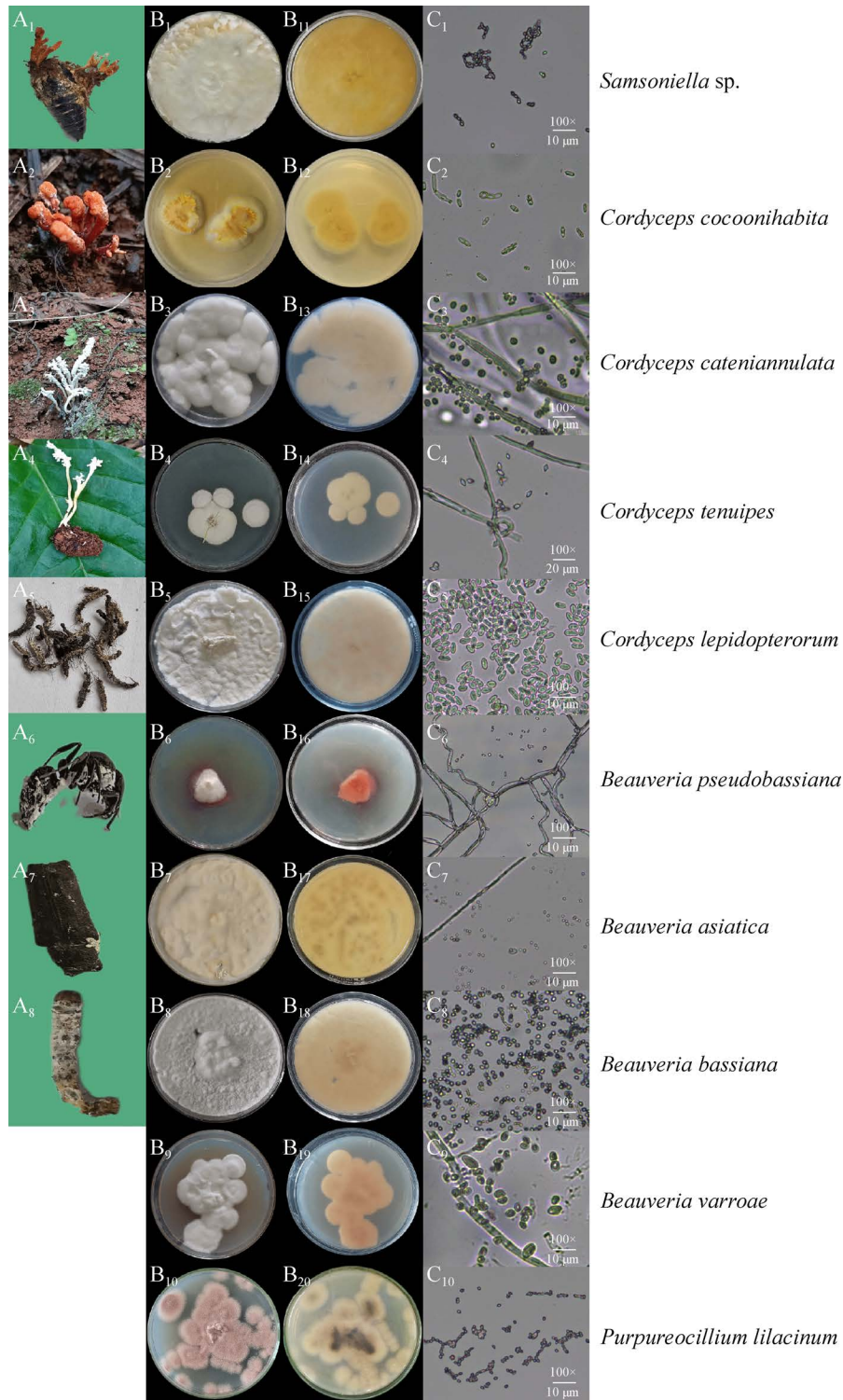


图 1 部分虫生真菌无性分离菌株菌落形态特征 A<sub>1</sub>–A<sub>8</sub>: 野生虫草样本. B<sub>1</sub>–B<sub>20</sub>: 菌落形态. C<sub>1</sub>–C<sub>10</sub>: 产孢结构. 标尺=10  $\mu$ m/20  $\mu$ m

Figure 1 The characteristics and microscopic features of some entomogenous fungi strains. A<sub>1</sub>–A<sub>8</sub>: Wild material. B<sub>1</sub>–B<sub>20</sub>: Colony on PDA. C<sub>1</sub>–C<sub>10</sub>: Conidiogenous structures. Bars=10  $\mu$ m/20  $\mu$ m.

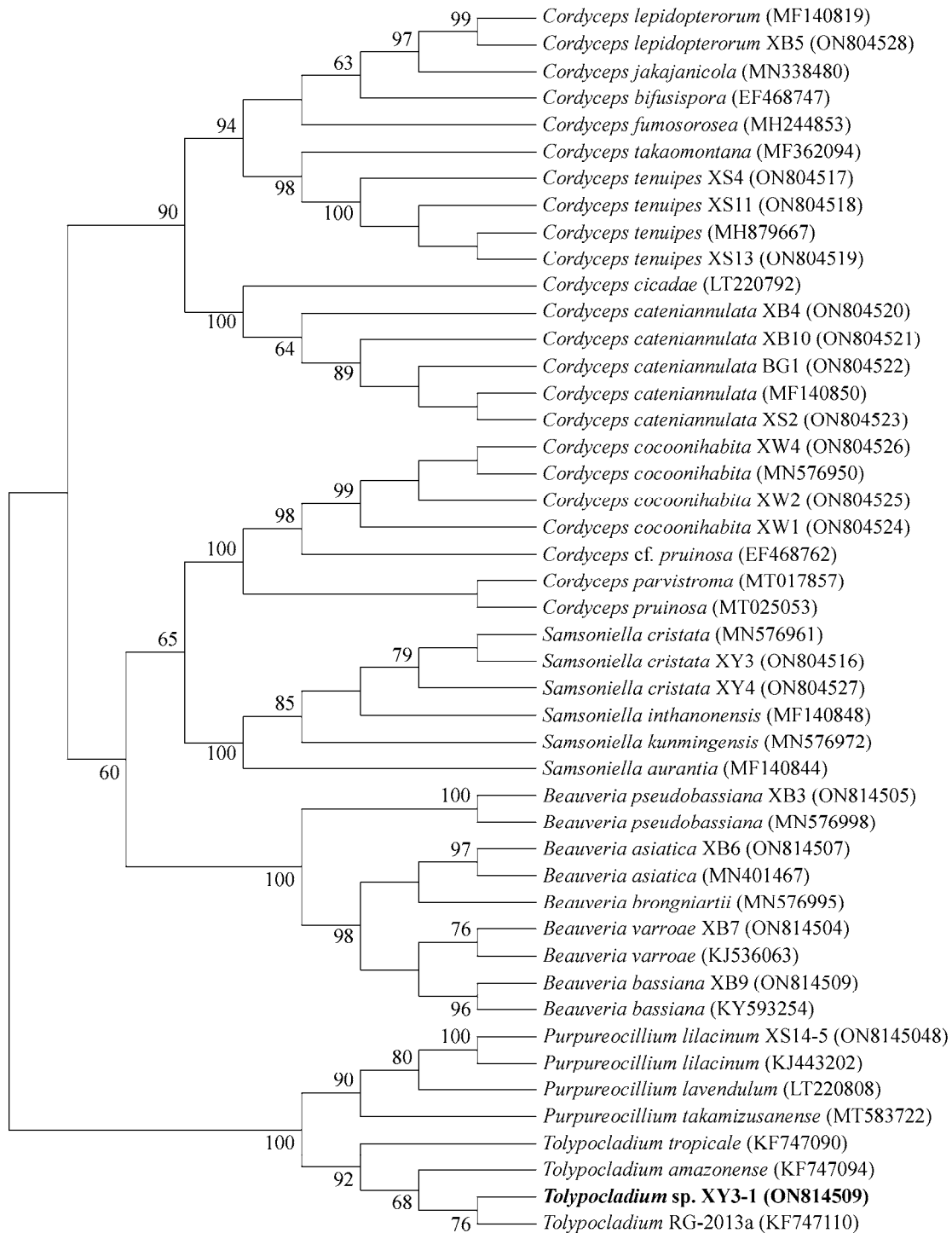


图 2 基于 EF1- $\alpha$  基因序列构建的虫生真菌系统发育树 括号内序号为该菌株 GenBank 登录号；内部节点数字为支持度，用于代表该分支结构的可靠程度。下同

Figure 2 Phylogenetic tree of entomogenous fungi based on EF1- $\alpha$  gene sequence. The serial number in bracket is the GenBank accession number of the strain; The number of internal nodes is support value, which represents the reliability of the branch structure. The same below.

表 2 昆明西山森林公园的虫生真菌物种

Table 2 Entomogenous fungi isolated and identified from Xishan Forest Park, Kunming City

Species	Genus	Family	Richness S value	Ecological dominance
<i>Samsoniella cristata</i>	<i>Samsoniella</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	1	0.000 000
<i>Samsoniella</i> sp.			1	0.000 000
<i>Cordyceps cocoonihabita</i>	<i>Cordyceps</i>		3	0.006 897
<i>Cordyceps cateniannulata</i>			15	0.241 380
<i>Cordyceps lepidopterorum</i>			1	0.000 000
<i>Cordyceps tenuipes</i>			3	0.006 897
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	<i>Beauveria</i>		1	0.000 000
<i>Beauveria bassiana</i>			1	0.000 000
<i>Beauveria varroae</i>			1	0.000 000
<i>Beauveria asiatica</i>			1	0.000 000
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Purpureocillium</i>	<i>Ophiocordycipitaceae</i>	1	0.000 000
<i>Tolypocladium</i> sp.	<i>Tolypocladium</i>		1	0.000 000

各物种丰富度值等于各物种数

The richness value of each species is equal to the number of each species.

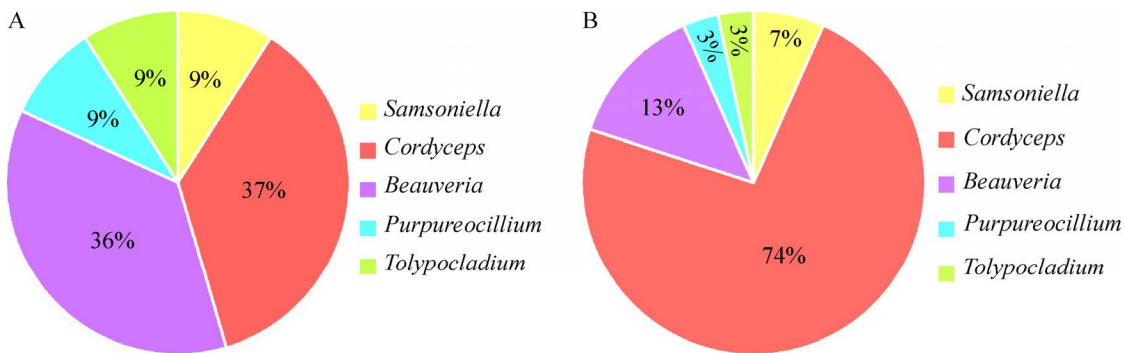


图 3 西山森林公园虫生真菌不同属的物种数(A)和样本数(B)占比

Figure 3 The proportion of species (A) and specimens (B) in different genera of entomogenous fungi in Xishan Forest Park.

在前期关于云南省虫草物种多样性的报道中, 赵志远等<sup>[26]</sup>通过对云南省弥渡县太极山广义虫草属物种多样性调查研究, 发现该地区虫草物种隶属于 2 科 5 属, 其中还包含 3 种疑似新种, 优势属为虫草属和白僵菌属, 优势种为蛹虫草(*Cordyceps militaris*)、细脚虫草和球孢白僵菌; 同时, 在大理巍山地区虫草物种多样性调查中研究发现该地区虫草物种隶属于 2 科 5 属 20 种, 其中有 7 种为疑似新物种, 优势属为虫草属, 优势种为蛹虫草<sup>[27]</sup>。范琪<sup>[15]</sup>对昆明地区不同海拔、不同生境进行的虫草物种

多样性调查研究, 共发现了 41 个虫草物种, 含 19 个隶属于 3 科 8 属的新物种, 其中优势属为虫草属和线虫草属, 优势种为高原线虫草(*Ophiocordyceps highlandensis*)、垂头虫草(*Ophiocordyceps nutans*)、细脚虫草和蛹虫草。本研究发现昆明西山森林公园的虫生真菌隶属于 2 科 5 属 12 种, 优势属同样为虫草属, 其检出菌株数占虫生真菌菌株总数的 74%。由此进一步表明虫草属为世界广布属<sup>[28]</sup>。在种水平, 本研究所获优势物种为环链虫草, 其生态优势度为 0.241 380, 表明不同地区虫草物种的分布



及数量存在一定差异。环链虫草是森林生态系统中的优势虫生真菌，其适应性广、生活能力强，易于培养，孢子丰富且易于扩散，因此可用于生物防治<sup>[29]</sup>。在本次调查中，只发现

2种线虫草物种无性型，这可能与线虫草寄主昆虫较为专一且侵染多发生于温度与湿度较高地区有关<sup>[30]</sup>。此外，本研究中发现的茧生虫草、环链虫草、细脚虫草、拟球孢白僵菌

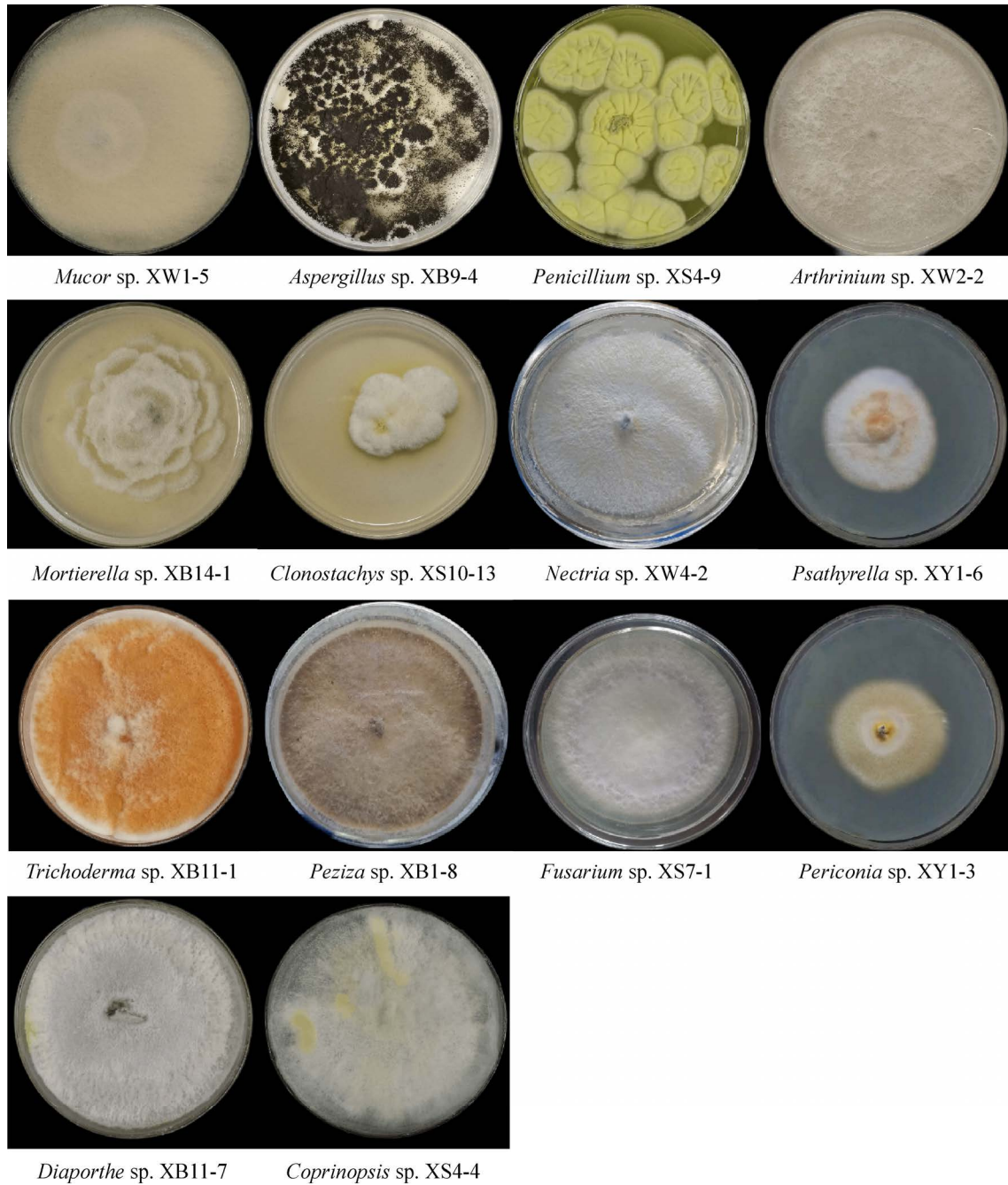


图 4 虫草内生真菌无性分离菌株菌落形态特征

Figure 4 The conidiogenous structures of endophytic fungi.

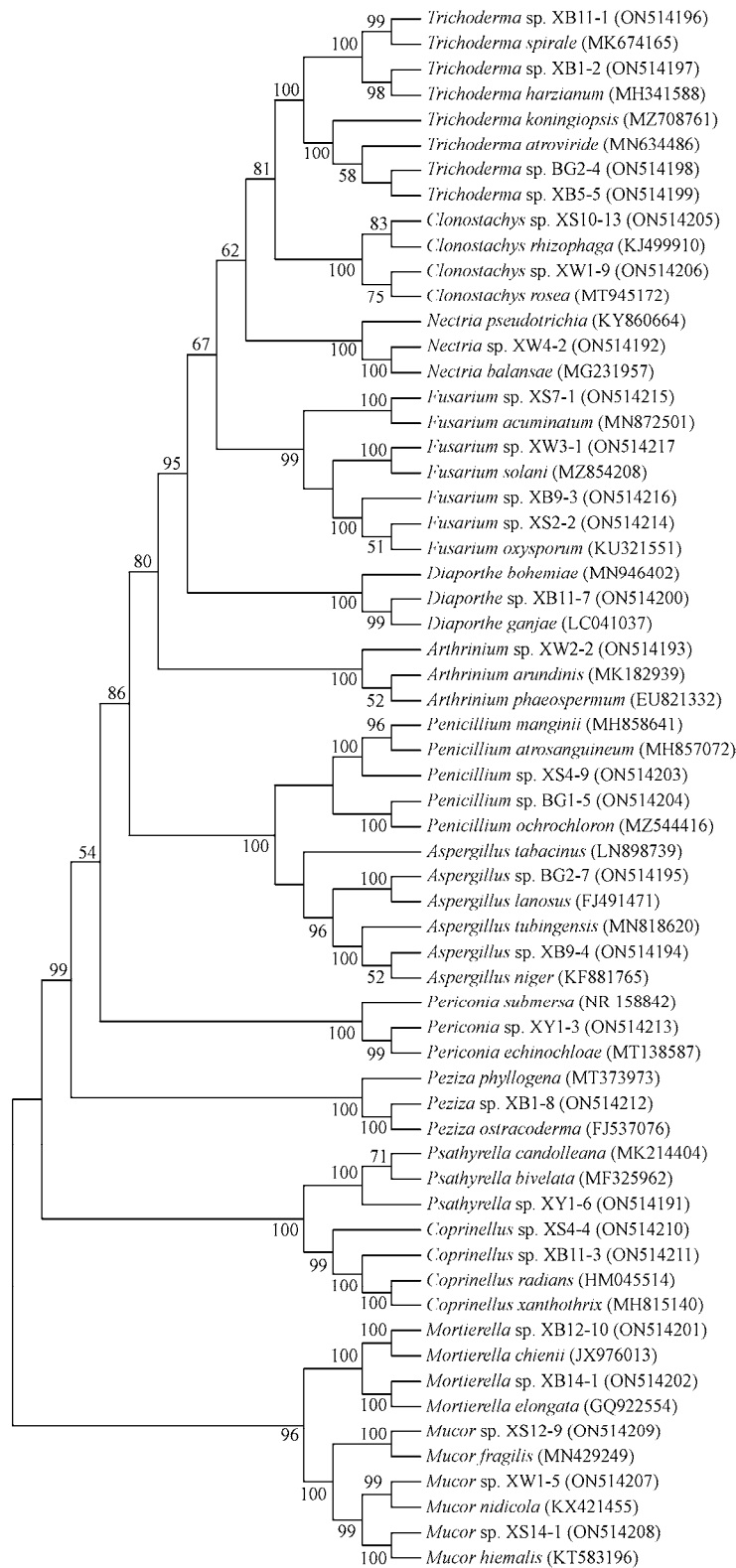


图 5 基于 ITS 序列构建的虫草内生真菌系统发育树

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

表3 昆明市西山森林公园虫草内生真菌多样性  
Table 3 Species diversity of endophytic fungi in Xishan Forest Park, Kunming City

Family	Genus	Number of isolates	Percentage (%)
Mucoraceae	<i>Mucor</i>	7	10
Mucedinaceae	<i>Trichoderma</i>	19	28
Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	2	3
Tuberculariaceae	<i>Fusarium</i>	13	19
Pezizaceae	<i>Peziza</i>	1	2
Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	6	9
Psathyrellaceae	<i>Coprinellus</i>	8	12
	<i>Psathyrella</i>	1	2
Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	1	2
Mortierellaceae	<i>Mortierella</i>	4	6
Bionectriaceae	<i>Clonostachysachys</i>	2	3
Periconiaceae	<i>Periconia</i>	1	2
Apiosporaceae	<i>Arthrinium</i>	1	1
Nectriaceae	<i>Nectria</i>	1	1
Total		67	100

和球孢白僵菌与前期昆明虫草物种多样性调查中关于西山森林公园的调查<sup>[15]</sup>一致,而冠鳞翅虫草、*C. lepidopterorum*、*B. asiatica*、*B. varroae*、淡紫紫孢菌及2种疑似新种为本研究首次发现,进一步丰富了西山地区虫草真菌资源数据库。

### 3.2 虫草真菌区系中内生真菌的多样性及应用潜力

自然环境中,内生菌类群丰富多样,其多样性体现在宿主多样性、物种多样性及分布多样性<sup>[31]</sup>。其中虫草作为一类特殊微生境,在其生长过程中以虫生真菌为主并伴随其他真菌类群生长,如高通量测序显示冬虫夏草<sup>[32]</sup>、高原线虫草<sup>[33]</sup>、蛹虫草<sup>[34]</sup>及其微生境中都分布有丰富的内生真菌类群。本研究通过纯培养分离的手段对西山森林公园虫草物种内生真菌进行分离鉴定得到67株属于13科14属的虫草内生真菌,其中主要以木霉属(28%)、镰刀菌属(19%)和毛霉属(10%)为优势内生真菌属,与张永杰

等<sup>[35]</sup>研究相一致。这表明内生真菌与虫生真菌在特殊生境下形成共生,具有菌群多样性。其中木霉属和镰刀菌属在土壤及植物体内广泛分布,对植物生长、抗逆与活性化合物产生等方面起着重要的作用。如研究显示名贵中药三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum*)葫芦状块根中的镰刀菌属菌株可以上调根茎叶各部 *th-exp* 基因的表达<sup>[36]</sup>;分布于杜仲皮中的镰刀菌属与杜仲活性成分松脂醇二葡萄糖苷及绿原酸含量呈正关联<sup>[37]</sup>。木霉属是土壤中主要的植物促生真菌,能显著改变根际土壤化学,调节土壤微生物群落,提高土壤生物量<sup>[38]</sup>; Zhai 等<sup>[39]</sup>研究发现棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)通过上调青蒿素生物合成关键酶基因提高了黄花蒿叶片中青蒿素浓度。此外,研究显示分布于丹参根际的可培养优势种卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)、土曲霉(*Aspergillus terreus*)和歧皱青霉(*Penicillium steckii*)等已被证实都能产 indole acetic acid (IAA),并对隐丹参酮和丹参酮 IIA 合成的促进效果比较显著<sup>[40]</sup>。这些来自药用植物且与药用植物的生长、代谢活动密不可分的内生真菌在本研究中主要分离自不同的虫草样本中,这些虫草内生菌类群在与宿主的长期协同进化过程中可能对虫生真菌的感染定殖、生长发育及活性代谢产物形成等方面可能发挥着重要作用,而且已有研究报道显示分布于蛹虫草微生物群落中的内生细菌 *Stenotrophomonas maltophilia* 与蛹虫草共培养后会抑制蛹虫草菌丝的生长和虫草素的生成<sup>[41]</sup>,分离自天然蝉花虫草(*Cordyceps cicadae*)中的内生细菌与蝉花虫草共培养后改变了蝉花虫草中的腺苷和核苷含量<sup>[42]</sup>。这表明在虫草真菌群落中除虫生真菌外,虫草内生真菌也是一群种类和资源丰富的物种,这类真菌可能会对虫草的生长发育及活性化合物的分泌产生一定的影响。本研究通过纯培养分离的手

段从不同虫草样本中获得类群丰富的内生真菌菌株, 为后期研究验证虫草微生物群落中内生真菌物种与虫草生长发育和活性代谢物相关性研究提供了参考菌株。

## 4 结论

本研究通过纯培养分离的方法, 从采自昆明市西山森林公园的天然虫草物种中得到 30 株分属于 2 科 5 属 12 种的虫生真菌, 以及 67 株分属于 13 科 14 属的内生真菌, 研究结果证实西山森林公园分布有丰富多样的虫草物种, 而且不同的虫草物种有不同种类的内生真菌与其共存。虫草及其内生真菌作为一类新兴的微生物资源, 虫草物种的多样性及特殊的生存环境和代谢途径赋予了其代谢产物丰富多样的可能性, 是挖掘新颖活性化合物的潜在来源。通过对虫草真菌区系的系统研究不仅有利于进一步挖掘虫草真菌的生态学功能, 而且可以提高资源的应用潜力, 并为进行开发利用提供依据。

## REFERENCES

- [1] 唐保宏, 苗文莉, 张一折. 河南省虫草资源调查研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(28): 12311-12312, 12323. TANG BH, MIAO WL, ZHANG YZ. Study on *Cordyceps* resources in Henan province[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(28): 12311-12312, 12323 (in Chinese).
- [2] 阙生全, 喻爱林, 刘亚军, 涂叶苟, 王小东, 熊彩云. 白僵菌应用研究进展[J]. 中国森林病虫, 2019, 38(2): 29-35. QUE SQ, YU AL, LIU YJ, TU YG, WANG XD, XIONG CY. Application research progress of *Beauveria*[J]. Forest Pest and Disease, 2019, 38(2): 29-35 (in Chinese).
- [3] 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.
- [4] 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).
- [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] 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.
- [7] ZHANG YJ, ZHANG S, WANG M, BAI FY, LIU XZ. High diversity of the fungal community structure in naturally-occurring *Ophiocordyceps sinensis*[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15570.
- [8] ZHU JS, GAO L, LI XH, YAO YS, ZHAO JQ. Maturation alteration of oppositely orientated rDNA and differential proliferation of GC- and AT-biased genotypes of *Ophiocordyceps sinensis* and *Paecilomyces hepiali* in natural *Cordyceps sinensis*[J]. American Journal of Biomedical Sciences, 2010: 217-238.
- [9] 阎佳, 张学玉, 刘锐. 金水宝胶囊临床应用和药理作用的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(4): 406-408. YAN J, ZHANG XY, LIU R. Research progress on the clinical application and pharmacological effect of Jinshuibao capsule[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2019, 35(4): 406-408 (in Chinese).
- [10] 王丽梅. 至灵胶囊质量标准提升研究[D]. 西安: 陕西科技大学硕士学位论文, 2021. Wang LM. Research on improving the quality standard of Zhiling capsule[D]. Xi'an: Master's Thesis of Shaanxi University of Science & Technology, 2021 (in Chinese).
- [11] MIN CL, MIN YJ, WANG XJ. *Bionectria ochroleuca* OS17: an endophytic fungus from *Ophiocordyceps sinensis* that produces cordycepin[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2019, 39(12): 2271-2277.
- [12] 聂斌英, 关爱国, 袁波. 亚香棒虫草内生真菌 C-10 转化多糖发酵工艺探讨[J]. 中国果菜, 2017, 37(11): 6-10. NIE BY, GUAN AG, YUAN B. Study on fermentation technology of polysaccharides from *Cordyceps hawkesii* endophytic fungus C-10[J]. China Fruit Vegetable, 2017,

- 37(11): 6-10 (in Chinese).
- [13] 王恒颖, 欧晓昆. 昆明西山常见草本植物在不同群落中的关联性研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2008, 30(S2): 391-397.  
WANG HY, OU XK. Research on the distribution and association of the representative herbs in Xishan Mountain, Kunming[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2008, 30(S2): 391-397 (in Chinese).
- [14] 梅象信, 徐正会, 张继玲, 赵宇翔. 昆明西山森林公园东坡蚂蚁物种多样性研究[J]. 林业科学研究, 2006, 19(2): 170-176.  
MEI XX, XU ZH, ZHANG JL, ZHAO YX. Ant species diversity on east slope of Xishan Forest Park in Kunming[J]. Forest Research, 2006, 19(2): 170-176 (in Chinese).
- [15] 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).
- [16] WESTPHAL KR, HEIDELBACH S, ZEUNER EJ, RIISGAARD-JENSEN M, NIELSEN ME, VESTERGAARD SZ, BEKKER NS, SKOVMARK J, OLESEN CK, THOMSEN KH, et al. The effects of different potato dextrose agar media on secondary metabolite production in *Fusarium*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 347: 109171.
- [17] 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).
- [18] 段东娥. 越南虫草科分类及系统发育研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2019.  
DUAN DE. Title taxonomy and phvlogeny of *Cordycipitaceae* from Vietnam[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2019 (in Chinese).
- [19] 代永东, 虞泓, 曾文波, 杨俊媛, 何璐. 多基因联合分析棒束孢属 *Isaria* (Ascomycota, Cordycipitaceae) 系统发育关系[J]. 菌物学报, 2016, 35(2): 147-160.  
DAI YD, YU H, ZENG WB, YANG JY, HE L. Multilocus phylogenetic analyses of the genus *Isaria* (Ascomycota, Cordycipitaceae)[J]. Mycosystema, 2016, 35(2): 147-160 (in Chinese).
- [20] 侯晓强, 任秀艳, 付亚娟, 王浩, 左秀丽, 吕寒聪, 张志丽. 北沙参内生真菌的抑菌活性与分类研究[J]. 中草药, 2015, 46(19): 2932-2936.  
HOU XQ, REN XY, FU YJ, WANG H, ZUO XL, LV HC, ZHANG ZL. Study on antimicrobial activity and classification of endophytic fungi from *Glehnia littoralis*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(19): 2932-2936 (in Chinese).
- [21] 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.
- [22] 孔凡洲, 于仁成, 徐子钧, 周名江. 应用 Excel 软件计算生物多样性指数[J]. 海洋科学, 2012, 36(4): 57-62.  
KONG FZ, YU RC, XU ZJ, ZHOU MJ. Application of excel in calculation of biodiversity indices[J]. Marine Sciences, 2012, 36(4): 57-62 (in Chinese).
- [23] 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).
- [24] 王秋华, 吴从起, 陶汝坤, 李明华, 阮德振, 李旭, 刘世远, 李世友. 昆明西山国家森林公园主要林型地表可燃物的特征[J]. 林业资源管理, 2012(5): 69-73, 93.  
WANG QH, WU CQ, TAO RK, LI MH, RUAN DZ, LI X, LIU SY, LI SY. Study on characteristics of main forest type's ground fuels of Xishan National Forest Park of Kunming[J]. Forest Resources Management, 2012(5): 69-73, 93 (in Chinese).
- [25] YOSIAKI ITÔ. Diversity of forest tree species in Yanbaru, the northern part of Okinawa Island[J]. Plant Ecology, 1997, 133: 125-133.
- [26] 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).
- [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] 陈自宏, 王元兵, 代永东, 陈凯, 徐玲, 何警成. 滇西

- 太保山森林公园子囊菌门虫生真菌物种多样性及其消长动态[J]. 生物多样性, 2019, 27(9): 993-1001.
- CHEN ZH, WANG YB, DAI YD, CHEN K, XU L, HE QC. Species diversity and seasonal fluctuation of entomogenous fungi of *Ascomycota* in Taibaoshan Forest Park in western Yunnan[J]. Biodiversity Science, 2019, 27(9): 993-1001 (in Chinese).
- [29] 李丰伯, 汪传友, 姚剑飞, 方乐金. 环链拟青霉防治黄山风景区细纹新须鳞[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(7): 77-78.
- LI FB, WANG CY, YAO JF, FANG LJ. Biological control of *Cenopalpus lineola* in mountain Huangshan scenic spot by *Paecilomyces cateniannulatus*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2011, 39(7): 77-78 (in Chinese).
- [30] 彭凡, 曹珊, 张琪, 李春如, 樊美珍. 安徽省万佛山地区虫草资源的初步调查[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(3): 400-403.
- PENG F, CAO S, ZHANG Q, LI CR, FAN MZ. Investigation on resources of *Cordyceps sensu lato* in Wanfoshan reserve[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2011, 38(3): 400-403 (in Chinese).
- [31] 李静. 甘薯内生真菌的分离鉴定及多样性分析[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2020.
- LI J. Isolation, identification and diversity analysis of endophytic fungi from *sweetpotato*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [32] ZHANG CB, REN CH, WANG YL, WANG QQ, WANG YS, WENG QB. Uncovering fungal community composition in natural habitat of *Ophiocordyceps sinensis* using high-throughput sequencing and culture-dependent approaches[J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 331.
- [33] 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).
- [34] 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.
- [35] 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, WANG M, LIU XZ, GONG WF. Mycobiotical investigation of natural *Ophiocordyceps sinensis* based on culture-dependent investigation[J]. Mycosystema, 2010, 29(4): 518-527 (in Chinese).
- [36] SONG YL, WU P, LI YF, TONG XX, ZHENG YF, CHEN ZH, WANG LL, XIANG TH. Effect of endophytic fungi on the host plant growth, expression of expansin gene and flavonoid content in *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg ex Diels[J]. Plant and Soil, 2017, 417(1-2): 393-402.
- [37] 杨娟. 杜仲相关真菌群落组成及其对活性成分的影响[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2019.
- YANG J. Community composition of the related fungi from *Eucommia ulmoides* and its active constituents[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2019 (in Chinese).
- [38] ZHANG FG, HUO YQ, COBB AB, LUO GW, ZHOU JQ, YANG GW, WILSON GWT, ZHANG YJ. *Trichoderma* biofertilizer links to altered soil chemistry, altered microbial communities, and improved grassland biomass[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 848.
- [39] ZHAI TT, WANG YF, LIU CL, LIU ZY, ZHAO M, CHANG Y, ZHANG RS. *Trichoderma asperellum* ACCC30536 inoculation improves soil nutrition and leaf artemisinin production in *Artemisia annua*[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2019, 41(4): 1-11.
- [40] 陈海敏. 丹参伴生微生物组及其优势种调控丹参酮合成的机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2020.
- CHEN HM. Deciphering *Salvia miltiorrhiza* associated microbiome and regulating mechanism of tanshinone biosynthesis by their dominant species[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2020 (in Chinese).
- [41] LUO L, ZHOU JX, XU ZS, GUAN JQ, GAO YM, ZOU X. Identification and functional analysis of bacteria in sclerotia of *Cordyceps militaris*[J]. PeerJ, 2021, 9: e12511.
- [42] QU QS, YANG F, ZHAO CY, SHI XY. Analysis of the bacteria community in wild *Cordyceps cicadae* and its influence on the production of HEA and nucleosides in *Cordyceps cicadae*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(6): 1759-1767.