



冬虫夏草菌和昆虫激素对 小金蝠蛾幼虫僵化、血淋巴和 肠道微生物以及血淋巴化学物质的影响*

吴 华** 曹 莉 饶中臣 刘桂清 唐 睿 韩日畴***

(广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室,
广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260)

摘 要 【目的】冬虫夏草是由冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 侵染蝙蝠蛾幼虫形成的一种独特而有价值的虫菌复合体。人工栽培冬虫夏草时, 将蝙蝠蛾幼虫血淋巴中的冬虫夏草菌芽生孢子诱导成为菌丝, 是被感染幼虫僵化的先决条件。为探讨冬虫夏草菌和昆虫激素对小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis* 幼虫僵化、血淋巴和肠道微生物以及血淋巴化学物质的影响。【方法】将冬虫夏草菌芽生孢子 (KD 菌株)、芽生孢子和蜕皮激素 (KD+20E)、芽生孢子和保幼激素 (甲氧普林) (KD+M)、20E 和 M 分别注射小金蝠蛾 6 龄幼虫, 以注射无菌 PBS、35% DMSO 以及未注射任何物质的幼虫作为对照, 测定幼虫的僵化率、血淋巴和肠道可培养微生物, 以及血淋巴的关键物质 (法尼醇、酪醇、麦角甾醇、蜕皮激素、保幼激素、葡萄糖、一氧化氮、海藻糖、N-乙酰葡萄糖胺) 的含量。【结果】注射 KD+M 120 d 后小金蝠蛾幼虫的僵化率显著提高。注射 KD+20E 的幼虫血淋巴中分离到更多细菌种类, 而注射 KD+M 幼虫血淋巴中分离得到更多真菌种类。 *Pseudomonas mucidolens*、 *Serratia proteamaculans* 和 *Tsukamurella standjordii* 细菌出现于所有处理和注射 PBS 的幼虫血淋巴中 (除了 *T. standjordii* 未出现于注射甲氧普林的幼虫血淋巴中); 高频率出现的真菌种类为 *Cladosporium* sp.、 *Isaria farinosa* 和 *Talaromyces* sp., 这些菌株均未出现在未注射幼虫的血淋巴中。7 种细菌 (*Carnobacterium maltaromaticum*、 *Flavobacterium frigidimarum*、 *Microbacterium oxydans*、 *P. mucidolens*、 *Rahnella aquatilis*、 *S. proteamaculans*、 *T. standjordii*) 和 1 种真菌 (*Apiotrichum porosum*) 出现于所有幼虫肠道中; *C. maltaromaticum* 是幼虫肠道优势种; 注射 KD+M 增加幼虫肠道真菌的可培养种类; 高频率出现的真菌种类为 *I. farinosa* 和 *Penicillium* sp.; 从幼虫肠道组织中未分离到 *Ophiocordyceps sinensis*。未注射芽生孢子、注射 KD+20E 的小金蝠蛾幼虫血淋巴中均未检测到 N-乙酰葡萄糖胺。与对照组相比, 注射芽生孢子和昆虫激素未显著改变血淋巴中法尼醇、蜕皮激素、海藻糖、一氧化氮的含量, 但注射 KD、KD+20E、KD+M、20E 和 M 45 d 时可提升幼虫血淋巴的保幼激素含量。无论携菌与否, 幼虫血淋巴中未检测到酪醇。【结论】注射冬虫夏草菌芽生孢子和昆虫激素, 可影响小金蝠蛾幼虫的僵化率、血淋巴和肠道微生物种类以及血淋巴内相关化学物质的含量。研究结果为有效提高冬虫夏草人工培育过程中的幼虫僵化率, 理解昆虫、真菌与昆虫激素的交互作用提供参考。

关键词 冬虫夏草; 蜕皮激素; 保幼激素; 芽生孢子-菌丝转化; 僵化; 微生物菌群

*资助项目 Supported projects: 广东省科学院千名博士 (后) 计划引进专项 (2020GDASYL20200103097 和 2019GDASYL-0103056); 广东省重点领域研发计划项目 (2020B1111580001); 国家自然科学基金项目 (31900368); 青海省重大科技专项 (2021-SF-A4-1)

**第一作者 First author, E-mail: wuhuaflower@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hanrc@giz.gd.cn

收稿日期 Received: 2021-10-05; 接受日期 Accepted: 2021-11-05

Effects of injection with *Ophiocordyceps sinensis* spores and insect hormones on larval mummification rate, hemolymph, gut microorganisms and hemolymph chemicals of *Thitarodes xiaojinensis*

WU Hua^{**} CAO Li RAO Zhong-Chen LIU Gui-Qing TANG Rui HAN Ri-Chou^{***}

(Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, China)

Abstract [Objectives] To investigate the effect of the fungus *Ophiocordyceps sinensis* (a unique and valuable parasitic complex formed by the infection and subsequent mummification of *Thitarodes* larvae by *O. sinensis*) and insect hormones on the blastospore-hypha conversion in *Thitarodes* larvae (the formation of hyphae from the blastospores of *O. sinensis* in the hemolymph of *Thitarodes* larvae is a prerequisite for the mummification of infected larvae). **[Methods]** One of five treatments; blastospores of *O. sinensis* (KD strain), a mixture of blastospores and 20-hydroxyecdysone (KD+20E), a mixture of blastospores and methoprene (KD+M), 20-hydroxyecdysone (20E) or Methoprene, were injected into sixth instar *T. xiaojinensis* larvae and the subsequent larval mummification rate, hemolymph and intestinal microorganisms and amounts of related substances (farnesol, ergosterol, ecdysterone, juvenile hormone III, N-acetylglucosamine, glucose, trehalose, nitric oxide) in larval hemolymph were compared. **[Results]** The mixture of blastospores and methoprene significantly increased the mummification rate of larvae after 120 days. More bacterial species were isolated from larval hemolymph injected with KD+20E, whereas more fungi were isolated from larvae injected with KD+M. Three bacterial species including *Pseudomonas mucidolens*, *Serratia proteamaculans* and *Tsukamurella standjordii*, were detected in all treatments, except for the absence of *T. standjordii* in the hemolymph of larvae injected with Methoprene. *Cladosporium* sp., *Isaria farinosa* and *Talaromyces* sp. were the most frequently observed fungal species, none of which were found in the hemolymph of larvae that had not been injected. Seven bacterial species, including *Carnobacterium maltaromaticum*, *Flavobacterium frigidimaris*, *Microbacterium oxydans*, *P. mucidolens*, *Rahnella aquatilis*, *S. proteamaculans* and *T. strandjordii*, as well as one fungal species, *Apiotrichum porosum* were detected in the guts of all treated larvae. *C. maltaromaticum* was the dominant bacterial species found in larval guts. The injection of KD+M increased the culturable fungal species in larval guts. The most common fungal species were *I. farinosa* and *Penicillium* sp., whereas *O. sinensis* was not isolated from larval guts. Compared to the control (PBS) group, the injection of blastospores of *O. sinensis* and insect hormones did not significantly change the levels of farnesol, 20E, trehalose and nitric oxide, but injection of the KD, KD+20E, KD+M, 20E and M increased the amount of juvenile hormone in larval hemolymph after 45 days. N-acetylglucosamine was absent in the hemolymph of larvae that were not injected or that had been injected with KD+20E. Tyrosol was not detected in the hemolymph of larvae irrespective of the presence or absence of *O. sinensis* blastospores. **[Conclusion]** The mummification rate, hemolymph, intestinal microorganisms and levels of related substances in the hemolymph, of *T. xiaojinensis* larvae were all affected by injecting them with blastospores of *O. sinensis*, 20-hydroxyecdysone or Methoprene. These results provide useful insights for improving the larval mummification rate during artificial cultivation of *O. sinensis*, and improve understanding of the interactions between insects and fungal pathogens.

Key words *Ophiocordyceps sinensis*; 20-hydroxyecdysone; methoprene; blastospore-hypha; mummification

冬虫夏草是由冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 侵染蝙蝠蛾幼虫形成的虫菌复合体，是青藏高原特有的名贵生物资源（丘雪红等，2016；韩日畴等，2019）。随着消费者对冬虫夏草认可度的提升，消费量剧增，野生冬虫夏草的产量已经无法满足市场需求。自沈南英等（1983）

在人工条件下获得冬虫夏草有性子实体以来，经过数十载的研究，冬虫夏草的人工培育已取得了重大突破，其中包括冬虫夏草菌子实体的人工培育（Cao *et al.*, 2015）、寄生昆虫蝙蝠蛾低海拔规模化人工饲养（曹莉和韩日畴，2014；Tao *et al.*, 2016；Li *et al.*, 2019）以及利用冬虫夏草菌感

染蝙蝠蛾幼虫获得媲美野生的冬虫夏草(张姝等, 2013; Zhao *et al.*, 2013; 韩日畴等, 2019; Li *et al.*, 2020), 极大地推动了高原生态环境和珍贵资源的保护和生物经济的发展。冬虫夏草菌感染蝙蝠蛾幼虫的途径主要分为体表(王忠等, 2001; 廖志勇, 2005; 陈威仁等, 2015; 李文佳等, 2016)、喂食(王忠等, 2001; 廖志勇, 2005; 涂永勤等, 2010, 2012; Lei *et al.*, 2015; 钟欣等, 2015)和注射(廖志勇, 2005; 王梅平, 2010; 曹莉等, 2019; Liu *et al.*, 2019) 3 种方式。真菌的退化、宿主幼虫因病原菌导致的高死亡率、低而缓慢的感染后僵化率等因素制约了冬虫夏草的高效生产(Zhou *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2018; 韩日畴等, 2019; Li *et al.*, 2019), 而影响僵化率高低的因素, 关键在于冬虫夏草菌在寄主昆虫体内由芽生孢子转化为菌丝的效率。

真菌二态型是指一些真菌在环境因子的影响下, 其菌体形态在酵母型与菌丝型发生相互转变的能力(祝丽彬等, 2017)。冬虫夏草菌是典型的二态型真菌(芽生孢子-菌丝), 在特定因素的诱导下, 可通过出芽生长产生更多的芽生孢子, 或通过顶端生长形成细长的菌丝体(假菌丝)和菌丝(Liu *et al.*, 2019, 2020)。在其它二态型真菌如玉米黑穗菌 *Ustilago maydis* 和白色念珠菌 *Candida albicans* 中, 已明确了某些外部因素可以影响其形态转变, 如营养因子(氮源、碳源)、化学因子(脂类、高级醇)、物理因子(温度、pH 值、气体环境)以及二态真菌形态转变的群体感应分子(Gauthier, 2015; 祝丽彬等, 2017; Desai, 2018; Kijpornyongpan and Aime, 2020)。在白色念珠菌中发现, L-脯氨酸、N-乙酰氨基葡萄糖、色氨酸、法尼醇、酪醇、法尼酸等在二态型转变过程中发挥作用(Han *et al.*, 2011)。一氧化氮在真菌中可参与调控如孢子萌发、子实体的发育和菌丝的生长, 也是调节真菌次生代谢的重要细胞内信号物质(Wang and Higgins, 2005; 王倩, 2013)。Liu 等(2019)报道 N-乙酰葡萄糖胺、脯氨酸、法尼醇、酪醇、甲基法尼酯、蜕皮激素可于昆虫体外不同程度地促进冬虫夏草菌芽生孢子转化为菌丝。但哪些化合物于寄主昆虫体内促进冬虫夏草菌芽生孢子

向菌丝转化仍未确定。

昆虫在一定程度上依赖于它们肠道中各种微生物群落来实现基本功能, 如营养、抵御寄生虫和病原体、调节免疫反应、交流和繁殖(Engel and Moran, 2013; Kwong and Moran, 2016; Wei *et al.*, 2017)。近年来学者通过培养法和非培养法从多种蝙蝠蛾幼虫的肠道中分离出多种微生物(卓凤萍等, 2004; Liang *et al.*, 2008, 2019; 刘莉等, 2008; 俞和韦等, 2008; Zhang *et al.*, 2009, 2010; Xia *et al.*, 2015, 2016), Wu 等(2020)进一步发现, 冬虫夏草菌感染显著改变小金蝠蛾幼虫血淋巴和肠道内的微生物菌群, 寄主血淋巴中的细菌和真菌可能影响冬虫夏草菌丝转化和子实体形成。

昆虫蜕皮激素(20E)和保幼激素(M)参与控制昆虫变态过程, 还影响生殖、滞育等许多生理活性, 是对昆虫生长非常重要的调控因子, 同时昆虫激素也是免疫系统的重要调节因子(Sorrentino *et al.*, 2002; Flatt *et al.*, 2008)。20E 通过昆虫细胞间粘连作用的提高增强昆虫细胞免疫作用(柴连琴, 2015), 并显著提高脂肪体中的识别受体包括肽聚糖识别蛋白(PGRP-SA)、PGRP-LE、革兰氏阴性结合蛋白(GNBP3)和抗菌肽(defensin, diptericin 和 lysozyme)的表达量(Han *et al.*, 2017)。相反结果也显示, 20E 可下调 EcR 依赖性抗菌肽基因如 defensin、drosocin、drosomycin、cecropin C、attacin A 等的表达量(Beckstead *et al.*, 2005); 家蚕注射 20E 6 h 后, AMP 基因 mRNA 水平显著降低(Matsui *et al.*, 2011); 20E 注射降低了家蚕血淋巴对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的抗菌活性(Tian *et al.*, 2010)。保幼激素可同时抑制黄粉虫(*Tenebrio molitor*)的酚氧化酶(PO)和包埋作用(Rantala *et al.*, 2003; Franssens *et al.*, 2006), 也可抑制埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 雌虫免疫相关基因(如抗菌肽等)(Chang *et al.*, 2021)。保幼激素抑制交配后的黑腹果蝇雌虫对病原的抵抗作用(Schwenke and Lazzaro, 2017), 降低赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 的细胞免疫(Kwon and Kim, 2007; Hapat and Kim, 2014), 还可延长被 *Metarhizium robertsii*

感染的黄粉虫雄虫的寿命,减少雌虫的存活时间 (Rantala *et al.*, 2020)。冬虫夏草菌进入蝙蝠蛾幼虫血腔后,昆虫激素也是其需要承受的胁迫压力之一。但是,同时注射昆虫激素与真菌是否影响昆虫血淋巴和肠道微生物以及血淋巴重要化学物质鲜有报道。

本文注射冬虫夏草菌芽生孢子、蜕皮激素或保幼激素类似物甲氧普林到小金蝠蛾幼虫血淋巴中,测定被注射蝠蛾幼虫第 120 天时的僵化率,第 3 天和第 45 天蝠蛾幼虫血淋巴和肠道的微生物菌群,以及幼虫血淋巴中关键化学物质(法尼醇、酪醇、麦角甾醇、蜕皮激素、保幼激素、葡萄糖、一氧化氮、海藻糖、N-乙酰葡萄糖胺)的含量,进而探讨促使冬虫夏草菌于昆虫体内从芽生孢子转化为菌丝的诱导因子,以及昆虫激素、真菌与寄主昆虫的交互作用。

1 材料与方法

1.1 小金蝠蛾幼虫饲养

小金蝠蛾幼虫于广东省科学院动物研究所资源昆虫与生物工程研究中心人工饲养获得 (Tao *et al.*, 2016), 6 龄幼虫用于注射感染。

1.2 冬虫夏草菌培养

冬虫夏草菌株以组织分离法分离自四川康定的野生冬虫夏草(编号: KD), 经分子鉴定后 (Cao *et al.*, 2015) 置于 -80 °C 的冷箱中保存。

冬虫夏草菌液体培养基 (PMG): 马铃薯 200 g 煮汁, 麦芽糖 20 g, 蛋白胨 10 g, 磷酸二氢钾 3 g, 硫酸镁 1.5 g, 维生素 B₁ 0.02 g, 鲜大蜡螟 *Galleria mellonella* 幼虫 5 g 研磨液, 以蒸馏水定容至 1 L, 分装至 250 mL 的三角瓶中, 每瓶 150 mL, 并于 121 °C 高压灭菌 30 min, 冷却后使用。

于超净工作台上, 将固体培养的冬虫夏草菌块 (约 0.5 cm³) 接种于上述液体培养基中, 置于 120 r·min⁻¹、9-13 °C 摇床上培养 45 d, 收集芽生孢子。收集芽生孢子的方法: 将液体培养液用 3 层无菌擦镜纸过滤, 收集滤液至 50 mL 已灭菌的离心管中, 8 000 r·min⁻¹、10 °C 离心 15 min,

弃掉上清液, 用无菌的磷酸盐缓冲液 (PBS; pH=7.0) 重悬, 再次离心弃掉上清液, 将收集到的芽生孢子以无菌 PBS 稀释至 6 × 10⁶ 个/mL 用于注射感染小金蝠蛾 6 龄幼虫。

1.3 昆虫激素配制

以 35% DMSO 作为溶剂, 将蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) (Toronto Research Chemicals) 和保幼激素类似物甲氧普林 (Methoprene, M) (Sigma) 配制浓度为 10 μg/μL 的溶液, 经 0.22 μm 细菌过滤器 (Millipore) 过滤后使用。

1.4 小金蝠蛾幼虫注射感染

实验设置如下处理组: A (KD): 注射冬虫夏草菌芽生孢子 (注射浓度 3 × 10⁶ 个/mL); B (KD+20E): 注射芽生孢子 (终浓度为 3 × 10⁶ 个/mL) 与蜕皮激素 (终浓度为 5 μg/μL) 的混合液 (二者 1:1 等体积混合); C (KD+M): 注射芽生孢子 (终浓度为 3 × 10⁶ 个/mL) 与甲氧普林 (终浓度为 5 μg/μL) 的混合液 (二者 1:1 等体积混合); D (20E): 注射蜕皮激素 (浓度为 5 μg/μL); E (M): 注射甲氧普林 (浓度为 5 μg/μL); F (对照组): 注射无菌 PBS; G (对照组): 注射 35% DMSO; H (对照组): 未注射。

利用显微注射仪 (Narishige, Japan) 将上述处理分别注射至人工饲养的小金蝠蛾 6 龄幼虫中, 注射方法参考曹莉等 (2019) 及 Liu 等 (2020); 每头幼虫的注射量为 4 μL。注射后的蝠蛾幼虫置于 8-10 °C 房间培养; 每个处理设置 900 头幼虫。

1.5 蝠蛾幼虫血淋巴微生物测定

在注射前、注射后 3 d、注射后 45 d 分别取样蝠蛾幼虫的血淋巴, 稀释 3 个浓度后使用 LB 固体培养基 (10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母粉、10 g 氯化钠, 定容到 1 L, 加入 16 g 琼脂粉, 高压蒸汽灭菌 121 °C, 30 min) 和 G5 固体培养基 (200 g 土豆煮汁, 20 g 葡萄糖, 10 g 胰蛋白胨, 1.5 g 磷酸二氢钾, 0.5 g 硫酸镁, 20 mg 维生素 B₁, 5 g 大蜡螟幼虫研磨液, 定容至 1 L, 加入

16 g 琼脂粉, 高压蒸汽灭菌 121 °C, 30 min) 分别涂板, 并平板置于 9-13 °C、23 °C、常氧和微氧 (11% 氧浓度) 的条件下培养。每个处理设置 3 块平板重复。

在超净工作台中, 先用无菌水冲洗幼虫体表, 再用 75% 无水乙醇消毒幼虫体表; 以微量取样针刺蝠蛾倒数第 2 对附足基部, 吸取血淋巴至 2 mL 灭菌离心管中; 每个处理取样 30 头, 10 头为一组单独收集至 2 mL 离心管中; 每管吸取 100 μ L 共 300 μ L 血淋巴进行混合, 以无菌的 PBS 定容至 1.8 mL 作为原液, 稀释 1 000 倍作为初始浓度, 然后分别稀释 10 倍和 100 倍 (共设置 3 个浓度梯度)。

涂板 14 d 后统计每个处理的菌株种类及菌株数, 先用肉眼观察进行分类和计数, 再利用分子方法进行鉴定、归类。分子鉴定细菌和真菌的方法参照 Wu 等 (2020)。首先使用 DNA 提取试剂盒 (广州美基生物科技有限公司, 中国) 进行微量 DNA 提取, 使用 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 引物进行扩增获得细菌 16sRNA 片段, 使用 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 引物进行扩增获得真菌 ITS 片段; 扩增体系为: 2 $\times$ EasyTaq SuperMix 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, 正反引物分别 1 μ L, DNA 模板 1 μ L。扩增条件为: 98 °C 加热 30 s, 然后在 98 °C 加热 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 加热 30 s, 35 个循环, 最后在 72 °C 进行 10 min 的延伸。经琼脂糖凝胶电泳确认 PCR 产物后, 将 PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。获得的菌株序列与 NCBI GenBank 中的数据集进行比对, 确定细菌和真菌种名。

1.6 蝠蛾幼虫肠道微生物测定

在注射前、注射后 3 d、注射后 45 d 分别取样蝠蛾幼虫的肠道液, 稀释 3 个浓度后使用 LB 固体培养基和 G5 固体培养基分别涂板, 并平板置于 9-13 °C、23 °C、常氧和微氧 (11% 氧浓度)

的条件下培养。每个处理设置 3 块平板重复。

在超净工作台中, 以无菌的剪刀解剖上述取完血淋巴后的蝠蛾幼虫, 取整条完整的肠道, 以无菌的 PBS 冲洗后, 放入 2 mL 灭菌研磨管中, 每 10 头幼虫的完整肠道收集至 1 管, 共取样 30 头分装至 3 管, 每管加入无菌研磨珠及 PBS 缓冲液定容至 1 mL, 漩涡震荡 2 min, 粉碎肠道组织和内容物, 每管吸取 100 μ L 肠道粉碎液进行混合, 用无菌的 PBS 定容至 1.8 mL 作为原液, 稀释 1 000 倍作为初始浓度, 然后分别稀释 10 倍和 100 倍 (共设置 3 个浓度梯度)。统计、鉴定菌株数目和种类的方法同 1.5。

1.7 蝠蛾幼虫血淋巴化学物质测定

1.7.1 法尼醇测定 收集的 1.0 mL 血淋巴加入冰预冷并装有少量苯基硫脲的离心管中, 加入等体积的 PBS 涡旋振荡, 加入 1 mL 乙酸乙酯, 涡旋振荡 5 min。常温 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 缓慢吸取最上层液体于烧杯中, 吸取下层液体弃去, 混合上层液体。加入 1 mL 乙酸乙酯混匀, 继续涡旋振荡 5 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集上清液与烧杯中的萃取液混合。于通风橱中挥干乙酸乙酯, 加入 100 μ L 甲醇溶解目标物, 吸取转移到离心管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 小心吸取上清液 50 μ L 于内插管进样瓶中。液相色谱仪采用 Agilent 1260 Infinity 系统, VWD 检测器, Agilent C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 液相色谱柱; 甲醇: 水=80: 20 作为流动相, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 λ =210 nm (Hornby *et al.*, 2001)。

1.7.2 酪醇、麦角甾醇、蜕皮激素、N-乙酰葡萄糖胺测定 取 600 μ L 血淋巴加入到等体积于冰中预冷的 75% 甲醇, 涡旋振荡混匀, 超声处理 5 min, 于 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 条件下离心 5 min, 收集上清液于冰预冷的 25 mL 烧杯中。往沉淀中加入 600 μ L 纯甲醇, 涡旋振荡混匀, 超声处理 5 min, 于 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 条件下离心 5 min, 收集上清液与烧杯中提取液混匀。往沉淀中加入 500 μ L 乙酸乙酯, 涡旋振荡混匀 5 min, 于 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 条件下离心 5 min, 收集上清液与

烧杯中提取液混匀。将收集的上清液采用氮气吹干仪于 35 °C, 氮气吹风速度为 0.02 MPa 下吹干 (<2 h), 加入 1.0 mL 甲醇超声充分溶解, 转移到 2.0 mL 容量瓶用甲醇定容, 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 注射器吸取上清液 1 mL 经过 0.22 μm 细菌过滤器除菌, 于 HPLC 样品瓶中进行 HPLC 分析, 剩下的样品溶液 4 °C 保存备用。

酪醇、麦角甾醇、蜕皮激素和 N-乙酰葡萄糖胺, 样品前处理方法一致, 均采用液相色谱仪 Agilent 1260 Infinity 系统, VWD 检测器。

酪醇: Agilent C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 液相色谱柱, 甲醇: 水 (0.1% 醋酸) (V: V) = 40: 60 作为流动相, 流速 0.75 mL/min, 检测波长 λ=280 nm (Ghosh *et al.*, 2008)。

麦角甾醇: Agilent C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 液相色谱柱, 甲醇: 水 (V: V) = 97: 3 为流动相, 流速 1 mL/min, 检测波长 λ=282 nm (董笑菲, 2019)。

1.7.3 蜕皮激素 Agilent C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 液相色谱柱, 甲醇: Pa (<2 h) 吹干, 加入 200 μL 甲醇充分溶解, 经过 0.22 μm 细菌过滤器除菌后用于 HPLC 分析。液相色谱仪采用 Agilent 1260 Infinity 系统, VWD 检测器, Agilent C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 液相色谱柱, 甲醇: 水 (V: V) = 75: 25 作为流动相, 流速 0.8 mL/min, 波长 λ=218 nm (钱明惠等, 2006)。

1.7.4 葡萄糖测定 每个样品分别取 100 μL 血淋巴置于加入 2 倍体积的蒸馏水, 携菌的样品葡萄糖浓度低于标准曲线范围不需要稀释, 直接取 200 μL 血淋巴, 75 °C 水浴 15 min。涡旋振荡后, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取澄清上清液 50 μL 于 96 孔酶标板, 每孔加入 100 μL 的葡萄糖分析试剂, 对照组以无菌蒸馏水替代葡萄糖试剂加入酶标板孔中, 每个孔加入试剂时间间隔为 30 s, 37 °C 恒温培养箱培养 30 min。加入 100 μL 6 mol/L 硫酸终止反应, 用酶标仪于 540 nm 测吸光度值, 样品的稀释倍数所测吸光度值在标准曲线范围内。

1.7.5 海藻糖测定 每个样品分别取 50 μL 血淋巴, 加入已装有 200 μL 超纯水的冰预冷离心

管中混匀, 立刻置于水浴锅中, 沸水浴 5 min, 取出涡旋振荡 5 min。将样品于 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集上清液至 2.0 mL 离心管中, 沉淀再加入 200 μL 超纯水, 涡旋振荡 5 min, 离心, 用移液枪收集上清液, 重复此操作 2 次。将收集的上清液于 -20 °C 冰箱预冻成冰, 置于冷冻干燥机干燥 12 h, 收集干燥的粉末。将干燥的粉末加入 200 μL 1-甲基咪唑充分溶解样品 30 min。将样品于 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分别取上清液 30 μL, 加入 100 μL 盐酸羟胺母液 (100 mg/mL), 充分混合均匀置于 80 °C 水浴中反应 5 min。取出加入 80 μL 乙酸酐, 混匀, 室温反应 5 min 后, 加入 1 mL 氯仿萃取衍生化产物。以 2 mL 水清洗 3 次, 加入 5% 无水硫酸钠, 过 0.22 μm 细菌过滤器除菌, 然后加进样瓶中, 进行 GC-MS 分析。气质联用色谱仪器型号 Agilent 6890N, 毛细管色谱柱 Agilent HP-5, MSD 检测器, 气室温度 250 °C, 检测器温度为 300 °C, 进样量为 1 μL, 分流方式设置为不分流; 程序为初始温度 50 °C, 保持 3 min, 升温程序为 50-220 °C (15 °C/min), 220-260 °C (10 °C/min), 保持 5 min, 260-270 °C (10 °C/min), 保持 15 min (胡磊等, 2004)。

1.7.6 一氧化氮的测定 取 600 μL 血淋巴加入冰预冷离心管中, 置于 -80 °C 保存待用。样品按照一氧化氮试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司, 中国) 的操作进行测定。

1.8 数据分析

不同处理和对照的蝠蛾幼虫存活率、携菌率、僵化率和血淋巴化学物质含量以 SPSS 软件 (16.0 software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行单因素方差分析, 以 Tukey HSD 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著性。

2 结果与分析

2.1 小金蝠蛾幼虫的存活率、携菌率和僵化率

2.1.1 存活率 8 个处理和对照的小金蝠蛾幼虫存活率见表 1。饲养 30 d 和 60 d 后, 注射 KD+20E ($F = 4.795$, $df = 7$, $P < 0.05$)、注射 20E

表 1 小金蝠蛾幼虫存活率
Table 1 Survival rates of the larvae of *Thitarodes xiaojinensis*

幼虫处理组 Larval treatment groups	30 d 存活率 (%) Survival rate after 30 days	60 d 存活率 (%) Survival rate after 60 days	90 d 存活率 Survival rate after 90 days	120 d 存活率 (%) Survival rate after 120 days
A	95.93±0.74ab	83.33±3.90abc	13.70±5.53c	9.63±4.55c
B	90.37±1.85b	79.63±0.74bc	18.15±2.06c	12.59±2.25c
C	93.33±0.64ab	86.67±1.70abc	20.37±4.64c	15.93±3.65c
D	89.26±0.98b	76.30±1.48c	64.81±3.03b	60.37±5.96b
E	94.81±2.43ab	87.04±2.67abc	78.15±4.98ab	58.52±2.59b
F	97.41±0.74a	89.63±3.16ab	74.44±4.84ab	72.15±3.23ab
G	95.56±1.92ab	86.67±2.22abc	71.85±2.25ab	65.56±4.01b
H	97.41±0.37a	92.96±1.61a	87.41±3.16a	85.56±3.39a

表中数值为平均值±标准误, 同列数值后标有不同字母表示在 0.05 水平差异显著, 采用 Tukey HSD 检验。

A: 注射冬虫夏草菌芽生孢子; B: 注射冬虫夏草菌芽生孢子与蜕皮激素的混合液; C: 注射冬虫夏草菌芽生孢子与甲氧普林的混合液; D: 注射蜕皮激素; E: 注射甲氧普林; F: 注射 1×PBS; G: 注射 35% DMSO; H: 未注射。

Data in the table are mean ± SE, and followed by different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level by Tukey HSD test. A: Injected *O. sinensis* blastospores; B: Injected a mixture of blastospore and 20-hydroxyecdysone; C: Injected a mixture of blastospore and methoprene; D: Injected 20-hydroxyecdysone; E: Injected methoprene; F: Injected 1 × PBS; G: Injected 35% DMSO; H: No injection.

($F = 4.795$, $df = 7$, $P < 0.05$) 的幼虫存活率显著低于对照组 H; 饲养 90 d 后, 注射 20E 的幼虫存活率显著低于未注射的对照组 ($F = 58.425$, $df = 7$, $P < 0.05$), 且注射 KD、KD+20E 或 KD+M 的幼虫存活率由于出现僵虫而急剧降低; 饲养 120 d 后, 除了注射 PBS 的幼虫, 其它处理的幼虫存活率均低于未注射的对照组。

2.1.2 携菌率 经荧光显微镜镜检, 注射后一个月, 仅注射 KD、KD+20E 或 KD+M 的幼虫血淋巴中携带冬虫夏草菌芽生孢子的幼虫比例分别为 100%、(96.67±3.33)% 和 (96.67±3.33)%, 经方差检验, 处理组之间没有显著差异; 注射后第 2 个月镜检时, 3 个处理幼虫血淋巴的携菌率均已达到 100%。芽生孢子浓度可根据同一倍数下血淋巴的数量进行判断。镜检发现, 注射 KD+20E 的幼虫血淋巴中仅观察到少量芽生孢子, 每个视野的芽孢数 5-10 个, 而注射 KD、KD+M 的幼虫血淋巴中观察到的虫草菌芽生孢子则大于 50 个。

2.1.3 僵化率 注射 KD、KD+20E、KD+M 的处理组, 幼虫于 90 d 开始出现僵化, 120 d 时的僵化率超过 40% (图 1)。注射 KD+M 的幼虫僵

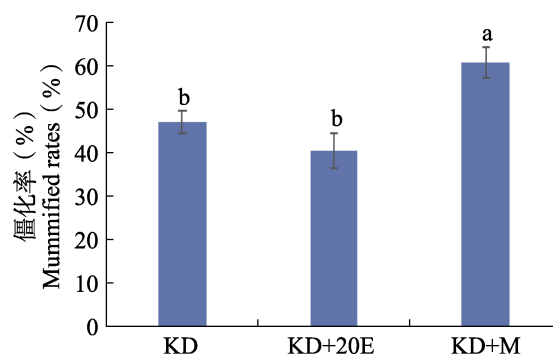


图 1 小金蝠蛾幼虫僵化率

Fig. 1 Mummified rates of the *Thitarodes xiaojinensis* larvae

KD: 注射冬虫夏草菌芽生孢子; KD+20E: 注射冬虫夏草菌芽生孢子+蜕皮激素; KD+M: 注射冬虫夏草菌芽生孢子+甲氧普林。柱上标有不同小写字母表示不同处理间在 5% 水平差异显著。

KD: Injected *O. sinensis* blastospores; KD+20E: Injected mixture of blastospore and 20-hydroxyecdysone; KD+M: Injected mixture of blastospore and methoprene. Histograms with different lowercase letters indicate significant difference at the 0.05 level.

化率为 (61.85±3.37)%, 显著高于注射 KD 和注射 KD+20E 的幼虫 ($F = 9.365$, $df = 2$, $P < 0.05$), 这说明同时注射冬虫夏草菌芽生孢子和

菌株种类 Strains	A			B			C			D			E			F			G			H		
	3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d	
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>																								+
橙色短波单胞菌 <i>Brevundimonas aurantiaca</i>		++			+			+																
麦芽香肉杆菌 <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>		++								+							+							+
<i>Chryseobacterium</i> sp.		++			+																			
鹌鸡肠球菌 <i>Enterococcus gallinarum</i>																	+							
冷海水黄杆菌 <i>Flavobacterium frigidimaris</i>	+	++			+																			
土地凯斯特亚菌 <i>Kaistia terrae</i>		++			+																			
氧化微杆菌 <i>Microbacterium oxydans</i>	+	++		+																				
<i>Microbacterium</i> sp.		+			+																			
微杆菌科 Microbacteriaceae													++											
<i>Micrococcus</i> sp.														+										
微球菌科 Micrococcaceae		+++			+++			+											+					
<i>Nocardiopsis</i> sp.														+										
土地杆菌属 <i>Pedobacter nototherniae</i>	+																							
<i>Pedobacter</i> sp.					+																			
霉味假单胞菌 <i>Pseudomonas mucidolens</i>	+			++			+		+		++		+											
布氏假单胞菌 <i>Pseudomonas brenneri</i>																	+							
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.			+																					+
水生拉恩氏菌 <i>Rahnella aquatilis</i>	+	+	++	+				+		+														
<i>Rhodococcus</i> sp.		++			++														+					
抗肿瘤活性海洋菌 <i>Serratia proteamaculans</i>	+	++	++	++			+		+	+						+								
嗜根寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas rhizophila</i>		+																						
肺冢村氏菌 <i>Tsukamurella strandjordii</i>	++	++	++	+		++	+++	++								+	+							
细菌种类 Bacterial species	7	14	5	11		2	4	3	2	4	3		3	3		0	2		0	3				
细菌种类汇总 Sum of bacterial species		16		13			5		5		7		5			2				3				
<i>Aspergillus</i> sp.							+																	
<i>Cladosporium</i> sp.									+		+		+											
双足囊菌科 Dipodascaceae											+													
虫草棒束孢 <i>Isaria farinosa</i>		+					+									++								

续表 2 (Table 2 continued)

菌株种类 Strains	A		B		C		D		E		F		G		H	
	3 d	45 d	3 d	45 d	3 d	45 d	3 d	45 d	3 d	45 d	3 d	45 d	3 d	45 d	3 d	45 d
冬虫夏草菌 <i>Ophiocordyceps sinensis</i>							++									
<i>Penicillium</i> sp.																
囊状青霉 <i>Penicillium capsulatum</i>							+									
<i>Talaromyces</i> sp.			+	+		+				+						
<i>Toxicocladosporium irritans</i>																+
真菌种类 Fungal species	0	1	1	1	0	5	1	0	2	1	1	1	0	0	0	1
真菌种类汇总 Sum of fungal species	1		1		5		1		3		2		0		1	

+代表菌株数<10 株, ++代表菌株数 10-100 株, +++代表菌株数 100-500 株。

A: 注射冬虫夏草菌芽生孢子; B: 注射冬虫夏草菌芽生孢子与蜕皮激素的混合液; C: 注射冬虫夏草菌芽生孢子与甲氧普林的混合液; D: 注射蜕皮激素; E: 注射甲氧普林; F: 注射 1×PBS; G: 注射 35% DMSO; H: 未注射。下表同。

+ indicates the number of strains less than 10; ++ indicates the number of strains from 10 to 100; +++ indicates the number of strains from 100 to 500.

A: Injected *O. sinensis* blastospores; B: Injected a mixture of blastospore and 20-hydroxyecdysone; C: Injected a mixture of blastospore and methoprene; D: Injected 20-hydroxyecdysone; E: Injected methoprene; F: Injected 1 × PBS; G: Injected 35% DMSO; H: No injection. The same below.

而其它 5 个处理组, 注射 3 d 和 45 d 时血淋巴中分离到的微生物种类差异较小 (表 2)。未进行注射的处理组, 饲养 3 d 后, 血淋巴中没有分离到细菌和真菌; 当饲养至 45 d 后, 血淋巴中分离到 *Pseudoxanthomonas* sp.、*C. maltaromaticum* 和 *Bacillus cereus* 3 种细菌和 *Toxicocladosporium irritans* 1 种真菌, 数量均较少 (全部平板中获得的菌株少于 10 个菌落)。

与未注射对照组相比, 注射 KD 的幼虫饲养 3 d 后血淋巴中获得的细菌种类明显增多, 共分离到 *F. frigidimaris*、*M. oxydans*、*Pedobacter nototheniae*、*P. mucidolens*、*R. aquatilis*、*S. proteamaculans*、*T. strandjordii* 7 种细菌, 没有分离到真菌; 饲养至 45 d 后血淋巴中的细菌种类高达 14 种 (表 2), 真菌种类仅 1 种 *I. farinosa*, 且数量较少。从注射 KD 的幼虫血淋巴中获得的微生物种类与未注射对照组的无交集。

与注射 KD 组相似, 饲养 3 d 后, 注射 KD+20E 的幼虫血淋巴中的细菌种类明显增多, 分离到 5 种细菌 (*M. oxydans*、*P. mucidolens*、*R. aquatilis*、*S. proteamaculans*、*T. strandjordii*) 和 1 种真菌 (*Talaromyces* sp.); 饲养至 45 d 时血

淋巴分离得到的细菌种类为 11 种 (表 2), 仅分离到 1 种真菌 (*Talaromyces* sp.), 且数量较少。

注射 KD+M 的幼虫血淋巴中 3 d 后仅分离到 2 种细菌 (*P. mucidolens* 和 *T. strandjordii*), 未获得真菌; 45 d 时血淋巴中分离到 4 种细菌 (*Brevundimonas aurantiaca*、*Micrococcaceae*、*S. proteamaculans*、*T. strandjordii*) 和 5 种真菌 (*Aspergillus* sp.、*I. farinosa*、*O. sinensis*、*P. capsulatum*、*Talaromyces* sp.), 除 *O. sinensis* 菌株数量为 32 株外, 其余真菌数量均小于 10 株; 与注射了 KD 或 KD+20EB 明显不同的是, 注射 KD+M 的幼虫血淋巴中获得冬虫夏草菌, 且真菌种类显著增多。

注射冬虫夏草菌芽生孢子的 3 组处理 (KD、KD+20E、KD+M) 的微生物种类与未注射对照组无交集; 3 组处理血淋巴中共同的细菌种类有 *B. aurantiaca*、*Micrococcaceae*、*P. mucidolens*、*S. proteamaculans* 和 *T. strandjordii*, 真菌出现频率较高 (同时出现在两个或两个以上的处理中) 的种类有 *I. farinosa* 和 *Talaromyces* sp.。与其他处理组相比, 注射冬虫夏草菌芽生孢子的 3 组具有 9 种特有细菌种类 (*B. aurantiaca*、

Chryseobacterium sp.、*F. frigidimaris*、*K. terrae*、*M. oxydans*、*Microbacterium* sp.、*P. nototheniae*、*Pedobacter* sp.、*S. rhizophila*), 3 种特有真菌种类 (*Aspergillus* sp.、*O. sinensis*、*P. capsulatum*)。

注射 20E 的幼虫饲养 3 d 后, 其血淋巴中分离到细菌 3 种 (*P. mucidolens*、*R. aquatilis*、*T. strandjordii*) 和真菌 1 种 (*Cladosporium* sp.), 45 d 时, 仅分离到 2 种细菌 (*C. maltaromaticum*、*S. proteamaculans*), 未分离到真菌。与未注射对照组相比, 单独注射 20E 与注射 KD+20E 的蝠蛾幼虫血淋巴中的细菌种类显著增加, 而真菌种类较少。

注射 M 的幼虫饲养 3 d 后, 其血淋巴中分离到细菌 4 种 (*Microbacteriaceae*、*P. mucidolens*、*R. aquatilis*、*S. proteamaculans*) 和真菌 2 种 (*Cladosporium* sp.、*Dipodascaceae*); 45 d 时, 分离到细菌 3 种 (*Enterococcus gallinarum*、*Micrococcus* sp.、*Nocardiopsis* sp.) 和真菌 1 种 (*Talaromyces* sp.)。与对照组相比, 单独注射甲氧普林或注射 KD+M 的蝠蛾幼虫血淋巴中真菌种类显著增加了。

注射 PBS 的幼虫饲养 3 d 后, 其血淋巴中分离到 3 种细菌 (*P. mucidolens*、*P. breunneri*、*T. strandjordii*) 和 1 种真菌 (*Cladosporium* sp.), 数量均较少 (<10 个菌落); 饲养至 45 d 时, 血淋巴中分离到 3 种细菌 (*C. maltaromaticum*、*S. proteamaculans*、*T. strandjordii*), 均小于 10 个菌落, 1 种真菌 *I. farinosa*。注射 35% DMSO 的幼虫饲养 3 d 后, 其血淋巴中没有分离到细菌和真菌; 饲养至 45 d 时, 血淋巴中分离到 2 种细菌 (*Micrococcaceae*、*Rhodococcus* sp.), 数量均较少 (<10 个菌落)。

2.2.2 肠道中的微生物 从 8 个处理和对照组的小金蝠蛾幼虫肠道中, 总共分离得到细菌 29 种, 真菌 17 种 (表 3); 共有的细菌种类有 7 种 (*C. maltaromaticum*、*F. frigidimaris*、*M. oxydans*、*P. mucidolens*、*R. aquatilis*、*S. proteamaculans*、*T. strandjordii*), 共有的真菌种类有 1 种 (*A. porosum*); 45 d 时蝠蛾肠道中分离到的微生物种类比 3 d 时的多 (表 3)。

与未注射对照组相比, 注射 KD 的幼虫饲养 3 d 后肠道中的细菌种类明显减少, 分离到 6 种细菌, 其中对照组中没有分离到的有 2 种 (*Bacillus* sp.、*T. strandjordii*), 同时得到 3 种真菌, 其中未注射对照组中没有分离到的有 2 种 (*Dipodascaceae*、*Volutella* sp.); 饲养至 45 d 后血淋巴中的细菌种类高达 14 种 (表 3), 真菌种类增加到 5 种, 与对照组相比特有的细菌种类有 *B. aurantiaca*、*Shinella kummerowiae*、*Yersinia massiliensis*, 真菌特有的种类有 *Ilyonectria* sp.、*Sclerotiniaceae*、*Volutella* sp.。

注射 KD+20E 的幼虫饲养 3 d 后肠道中的细菌种类与未注射对照相近, 仅 1 株细菌不同 (*P. breunneri*), 2 种真菌不同 (*Sporothrix* sp.、*Volutella* sp.); 饲养至 45 d 后肠道中的细菌种类高达 15 种 (表 3), 真菌种类增加到 5 种。

注射 KD+M 的幼虫不论是 3 d 和 45 d 取样, 与未注射对照组相比, 其肠道中分离到的细菌种类均接近, 但真菌种类显著增多, 尤其是 45 d 时, 真菌种类高达 9 种。

与其他 5 个处理组相比, 注射芽生孢子的处理组 (KD、KD+20E、KD+M) 幼虫肠道中特有的细菌种类有 3 种 (*Nocardiopsis* sp.、*S. kummerowiae*、*Y. massiliensis*), 特有的真菌种类有 10 种 (*C. lacerata*、*Clonostachys* sp.、*Dipodascaceae*、*Ilyonectria* sp.、*Mucor hiemalis*、*Mucor* sp.、*P. capsulatum*、*Sclerotiniaceae*、*Sporothrix* sp.、*Talaromyces* sp.); 值得注意的是, 从幼虫肠道中未分离到 *O. sinensis*。

注射 20E 的幼虫饲养 3 d 后, 从肠道中分离到细菌 7 种和真菌 2 种; 45 d 后, 分离到 9 种细菌和 2 种真菌, 两个时间点微生物种类差异不明显, 与未注射对照组相比差异也不明显。

注射 M 的幼虫饲养 3 d 后, 肠道中分离到细菌 8 种和真菌 4 种; 45 d 后, 分离到 12 种细菌和 3 种真菌, 45 d 时肠道中的细菌种类明显增多。与未注射对照组相比, 真菌种类增加 3 种 (*Papulaspora* sp.、*P. citrinum*、*Volutella* sp.)。

注射 PBS 的幼虫饲养 3 d 后, 分离到细菌 8 种和真菌 2 种; 45 d 后, 分离到 16 种细菌和 3

表 3 小金蝠蛾幼虫肠道中分离到的细菌和真菌
Table 3 Bacterial and fungal species identified from the larval gut of *Thitarodes xiaojinensis*

菌株种类 Strains	A			B			C			D			E			F			G			H		
	3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d	
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>													++											
<i>Bacillus</i> sp.	+															+								
橙色短波单胞菌 <i>Brevundimonas aurantiaca</i>		++											+							+				
麦芽香肉杆菌 <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>		+++		+++	+++		++	+++++		+++	+++	+++	+++++			+++	+++	+++		+++	+++		+++	+
<i>Chryseobacterium</i> sp.					+						+													
鸚鸡肠球菌 <i>Enterococcus gallinarum</i>		++		++	++						+					+								+
冷海水黄杆菌 <i>Flavobacterium frigidimaris</i>	+	+++		+++	+++		++	++		++	++		+		+++	+++	+++		++	++		+	++	
深蓝紫色杆菌 <i>Janthinobacterium lividum</i>							+++															+		
土地凯斯特亚菌 <i>Kaistia terrae</i>		++					+								+				+	+			+	
氧化微杆菌 <i>Microbacterium oxydans</i>	+	+		+	+		++	++		+	+	+	+	+	+++	++	++	++	+	++	++		++	++
<i>Microbacterium</i> sp.					+			++							++									
微杆菌科 <i>Microbacteriaceae</i>	+	+		+++	+		+	+		+++	+	+	++						++	++	+		++	
微球菌科 <i>Micrococcaceae</i>	+++						+			++	++		+		++				++	++			++	
<i>Nocardiopsis</i> sp.				+++																				
<i>Pedobacter nototherniae</i>							++									+				+				
<i>Pedobacter</i> sp.													+++											
霉味假单胞菌 <i>Pseudomonas mucidolens</i>	+			+	+		++	++		++	++		++		++	+	++	++		++	++		++	
布氏假单胞菌 <i>Pseudomonas brenneri</i>							++	++		++	++				+									
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.					+			++		++	++				++				+	+			+	
水生拉恩氏菌 <i>Rahnella aquatilis</i>	+	++		++	++		+++++	++		++	++		++		+	++	++	++	++	++	++		++	++
土生拉乌尔菌 <i>Raoultella terrigena</i>													+						+					
<i>Rhizobium</i> sp.													+		+									
<i>Rhodococcus</i> sp.		++			+		++				++		++		+++				++	++		+	++	++
抗肿瘤活性海洋菌 <i>Serratia proteamaculans</i>	+++			+++	+++		++	++		+++	+++	+++	+		+++	+	+++	+++	+++	+++	+++		+++	+++

续表 3 (Table 3 continued)

菌株种类 Strains	A			B			C			D			E			F			G			H		
	3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d		3 d	45 d	
鸡眼草申氏菌 <i>Shinella kummerowiae</i>		+																						
嗜根寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas rhizophila</i>		++			+			++						+			+			++				++
利尻链霉菌 <i>Streptomyces rishiriensis</i>																								
肺炎村氏菌 <i>Tsukamurella strandjordii</i>	+	++		++	+			++		++			+	+		+	+		+		+			+
马赛耶尔森氏菌 <i>Yersinia massiliensis</i>		++																						
细菌种类 Bacterial species	6	15	8	15	8	12	8	12	12	7	9	8	12	12	15	8	16	7	15	10	12			
细菌种类汇总 Sum of bacterial species	17			16		16										18		17		16				
<i>Apiotrichum porosum</i>	+++	+++		+	+++		++	+++		+	+++	+	++	+	++	+	+++	+	+++	++	+++			+++
撕裂蜡卧孔菌 <i>Ceriporia lacerata</i>							+																	
<i>Cladosporium</i> sp.																+								
<i>Clonostachys</i> sp.							+																	
双足囊菌科 Dipodascaceae	+				+		++																	
<i>Ilyonectria</i> sp.		+			+		+																	
虫草棒束孢 <i>Isaria farinosa</i>		+					+					+					+							+
冻土毛霉 <i>Mucor hiemalis</i>							+																	
<i>Mucor</i> sp.							++																	
<i>Papulaspora</i> sp.													+											
桔青霉 <i>Penicillium citrinum</i>													+											
囊状青霉 <i>Penicillium capsulatum</i>					+++																			
<i>Penicillium</i> sp.							+					+		+			+		+					+
核盘菌科 Sclerotiniaceae		+																						
<i>Sporothrix</i> sp.					+																			
<i>Talaromyces</i> sp.																								
<i>Volutella</i> sp.	+	+		+			++			+			+				+++		++					
真菌种类 Fungal species	3	5	3	5	3	5	4	9	2	2	2	4	3	2	3	1	3	2	3	2	2			
真菌种类汇总 Sum of fungal species	6			7		11			3			6		4		3		3		3				3

种真菌, 细菌种类明显增加。注射 35% DMSO 的幼虫饲养 3 d 后, 分离到细菌 7 种和真菌 1 种; 45 d 后分离到 15 种细菌和 3 种真菌, 与注射 PBS 的幼虫一样, 其肠道细菌种类明显增加。未注射幼虫饲养 3 d 后, 肠道中分离到 10 种细菌和 2 种真菌; 当饲养至 45 d 后, 分离到 12 种细菌和 2 种真菌, 两个时间点的微生物种类并不完全相同。

从小金蝠蛾幼虫肠道中, 总共分离细菌 29 种, 真菌 17 种。在 8 个组中均出现的细菌种类有 7 种 (*C. maltaromaticum*、*F. frigidimaris*、*M. oxydans*、*P. mucidolens*、*R. aquatilis*、*S. proteamaculans*、*T. strandjordii*), 真菌种类有 1 种 (*A. porosum*)。 *C. maltaromaticum* 是幼虫肠道优势种。与未注射组相比, 45 d 时蝠蛾肠道中分离到的微生物种类比 3 d 时的普遍偏多, 尤其是同时注射芽生孢子和甲氧普林的组 C 中真菌种类高达 11 种 (未注射组 3 种、仅注射芽生孢子组 6 种)。 *I. farinosa* 出现于 A、C、E、F 和 H 处理组中, *Penicillium* sp. 出现于 C、D、E、G 和 H 处理组中。

比较幼虫血淋巴和肠道中获得的细菌和真菌种类发现, 血淋巴中出现的几乎所有微生物种

类 (细菌 23 种, 真菌 7 种) 都存在于幼虫肠道中, 除了细菌 *Micrococcus* sp. 和真菌 *Aspergillus* sp.、*T. irritans*, 说明仅注射芽生孢子或注射芽生孢子与昆虫激素后肠道微生物向血淋巴转移, 更多的细菌种类向注射芽生孢子和蜕皮激素的幼虫血淋巴转移, 更多的真菌向注射芽生孢子和甲氧普林的幼虫血淋巴转移。

2.3 小金蝠蛾血淋巴中化学物质含量

未注射和被注射冬虫夏草菌芽生孢子、蜕皮激素以及甲氧普林的小金蝠蛾幼虫 3 d 和 45 d 的血淋巴化学物质含量如图 2、图 3 和图 4 所示。除了酪醇和 N-乙酰葡萄糖胺, 其他化合物包括法尼醇、麦角甾醇、蜕皮激素、保幼激素、葡萄糖、海藻糖、一氧化氮均在未注射幼虫中检测到。在携菌幼虫中也未检测到酪醇。与未注射任何物质的幼虫相比, 注射 PBS 和 35% DMSO 的幼虫体内检测成分未显著改变。

2.3.1 法尼醇 处理后第 3 天, 法尼醇含量在未注射幼虫、注射 PBS 或 KD 的幼虫中的含量依次为 0.20、0.18 和 0.20 ng/μL, 3 组之间未见显著差异 ($F = 10.905$, $df = 7$, $P = 0.442 > 0.05$)。在分别注射 35% DMSO、KD+20E、KD+M、20E、

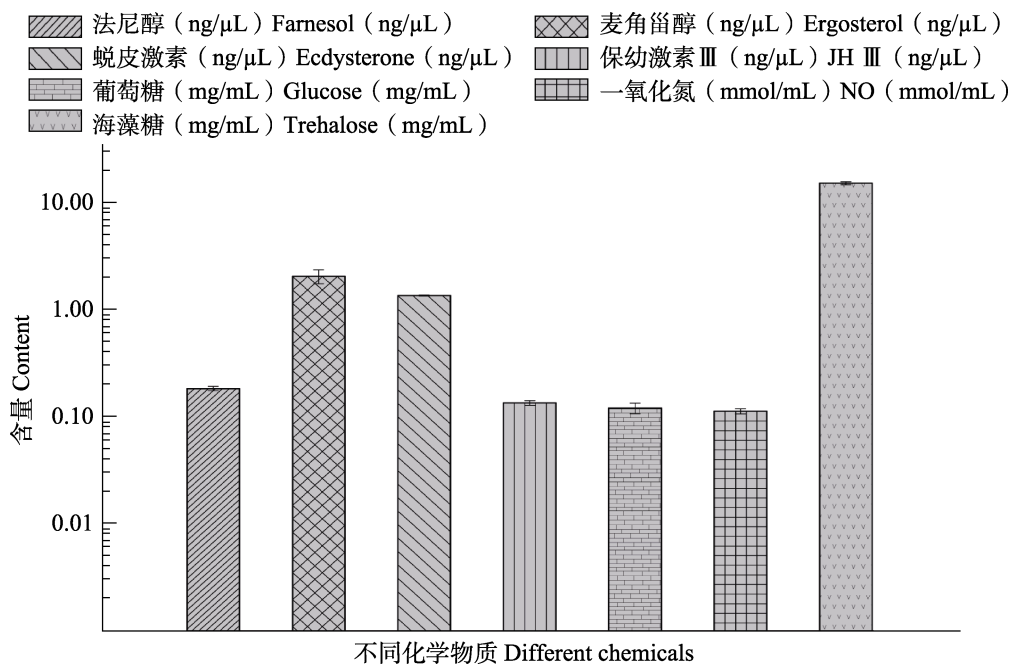


图 2 未注射小金蝠蛾幼虫血淋巴化学物质含量
Fig. 2 Chemical contents from the uninjected larvae of *Thitarodes xiaojinensis*

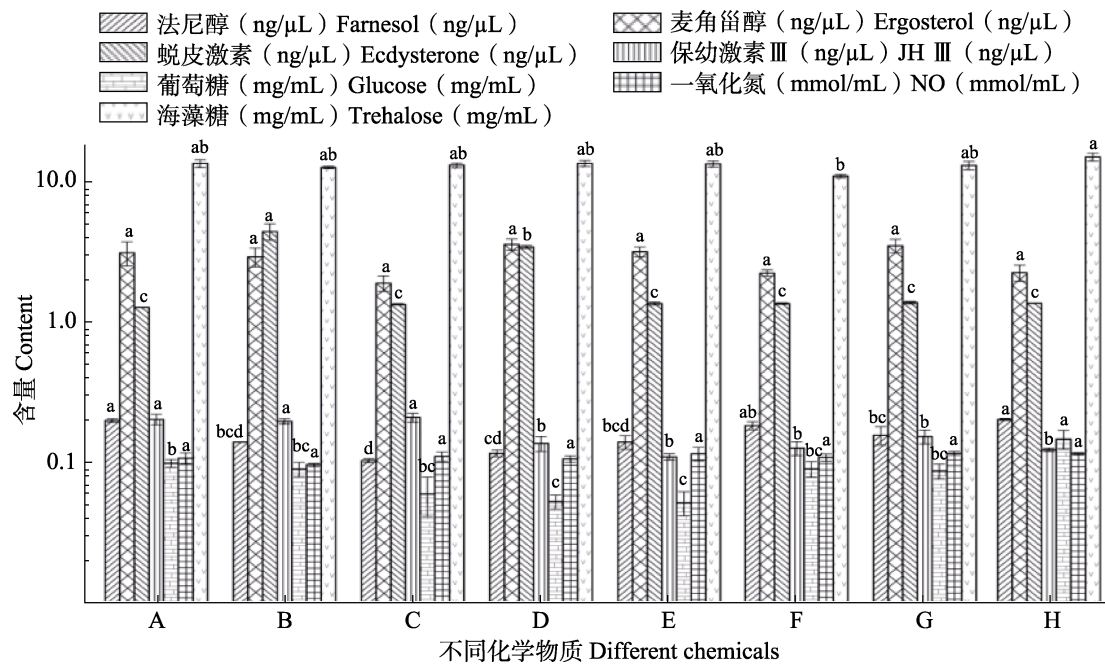


图3 蝠蛾幼虫不同处理后第3天测定血淋巴中化学物质的含量

Fig. 3 The contents of chemical substances in hemolymph were measured on the 3rd day after different treatment of the larvae

A: 注射芽生孢子; B: 注射芽生孢子与蜕皮激素的混合液; C: 注射芽生孢子与甲氧普林的混合液;
D: 注射蜕皮激素 (注射浓度为 $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$); E: 注射甲氧普林; F: 注射 $1 \times \text{PBS}$; G: 注射 35% DMSO;
H: 未注射。纵坐标代表信息物质和糖类的含量。图例标注不同的检测物质和对应的单位。下图同。
A: Injected *O. sinensis* blastospores; B: Injected a mixture of blastospore and 20-hydroxyecdysone; C: Injected a mixture of blastospore and methoprene; D: Injected 20-hydroxyecdysone; E: Injected methoprene; F: Injected $1 \times \text{PBS}$;
G: Injected 35% DMSO; H: No injection. The vertical axis is the content of information substances and sugars. The legend indicates the different substances to be tested and the corresponding units. The same below.

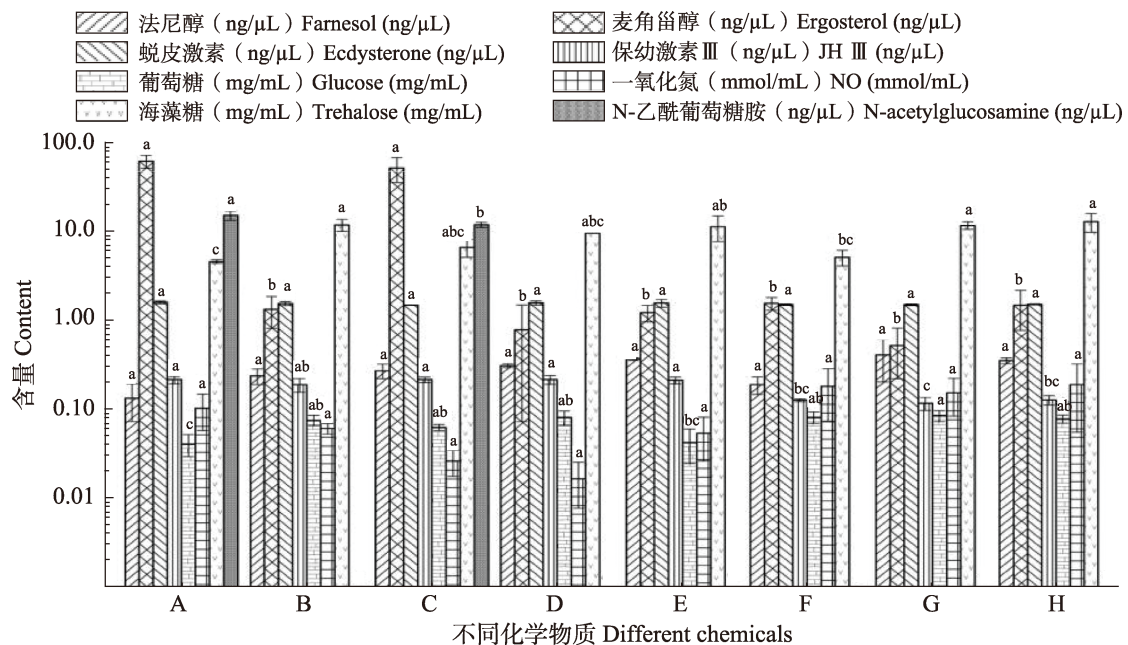


图4 蝠蛾幼虫不同处理后第45天测定血淋巴中化学物质的含量

Fig. 4 The contents of chemical substances in hemolymph were measured on the 45th day after different treatment of the larvae

M 的幼虫中法尼醇含量也未见显著差异 ($F = 10.905$, $df = 7$, $P = 0.141 > 0.05$); 但未注射任何物质的幼虫和注射 KD 的幼虫中的法尼醇含量显著高于注射 35% DMSO、KD+20E、KD+M、20E、M 的幼虫中法尼醇含量。这说明小金蝠蛾幼虫血淋巴中存在法尼醇, 注射 35% DMSO、蜕皮激素和甲氧普林 3 d 时可降低幼虫体内法尼醇含量 (图 3), 但在注射 45 d 后, 不同处理与对照之间的幼虫体内法尼醇含量未见显著差异 ($F = 1.314$, $df = 7$, $P = 0.052 > 0.05$) (图 4)。在第 45 天时, 注射芽生孢子或 KD+M 的幼虫血淋巴中已出现大量芽生孢子, 说明芽生孢子大量出现未能提高血淋巴中法尼醇的含量。

2.3.2 麦角甾醇 处理后第 3 天, 麦角甾醇含量在所有处理和对照组中均没有显著差异 ($F = 3.029$, $df = 7$, $P = 0.071 > 0.05$); 处理后第 45 天, 注射 KD ($62.96 \text{ ng}/\mu\text{L}$)、注射 KD+M ($52.67 \text{ ng}/\mu\text{L}$) 的麦角甾醇含量显著高于其它处理和对照 ($F = 44.767$, $df = 7$, $P < 0.05$)。小金蝠蛾幼虫未携菌血淋巴中也存在麦角甾醇。这可能是携带虫草菌组大量出现的芽生孢子分泌麦角甾醇的原因或者菌体生长诱导幼虫产生大量麦角甾醇。注射了 KD+20E 的幼虫血淋巴中麦角甾醇含量也显著低于注射芽生孢子 ($62.96 \text{ ng}/\mu\text{L}$) 或注射 KD+M 的处理, 说明注射蜕皮激素干扰体内菌体生长导致麦角甾醇含量偏低, 因为注射芽生孢子和蜕皮激素的幼虫血淋巴中仅观察到少量芽生孢子。冬虫夏草菌体细胞中麦角甾醇含量范围为 $0.47\text{--}0.64 \text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$ (湿重), 对应菌液上清液麦角甾醇含量范围为 $0.11\text{--}2.25 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.3.3 蜕皮激素 处理后第 3 天, 注射 KD+20E ($4.45 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 以及仅注射 20E ($3.45 \text{ ng}/\mu\text{L}$) 幼虫的蜕皮激素含量显著高于其它处理和对照 ($F = 33.132$, $df = 7$, $P < 0.05$) (图 3)。这可能与幼虫被注射蜕皮激素有关。处理后第 45 天, 各处理和对照组幼虫血淋巴中的蜕皮激素含量未见显著差异 ($F = 0.262$, $df = 7$, $P = 0.386 > 0.05$)。

2.3.4 保幼激素 处理后第 3 天, 注射 KD、KD+20E、KD+M 的幼虫血淋巴的保幼激素 III 的

含量显著高于其它处理和对照 ($F = 8.740$, $df = 7$, $P < 0.05$), 其它处理和对照幼虫血淋巴中的保幼激素 III 含量未见显著性差异 ($F = 8.740$, $df = 7$, $P = 0.207 > 0.05$) (图 3)。处理后第 45 天, 未注射幼虫、注射 PBS 和注射 35% DMSO 的对照组幼虫血淋巴的保幼激素含量显著低于处理组幼虫的, 而且处理组之间未呈现显著差异 (图 4)。这说明注射芽生孢子、蜕皮激素和甲氧普林均可导致蝠蛾幼虫血淋巴内保幼激素含量升高。

2.3.5 N-乙酰葡萄糖胺 处理后第 3 天, 在各处理和对照组均未检测到 N-乙酰葡萄糖胺。从菌液细胞体和上清液检测结果表明菌体细胞内和胞外均含有 N-乙酰葡萄糖胺, 菌体细胞 N-乙酰葡萄糖胺含量范围 $0.13\text{--}2.52 \text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$ (湿重), 对应菌液的含量范围为 $28.41\text{--}137.3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。第 3 天检测结果中 A、B、C 3 组样品均注射菌体但未检测到 N-乙酰葡萄糖胺, 原因可能是注射菌体数量太少而 N-乙酰葡萄糖胺含量低于仪器方法的检出限未能被检测出。处理后第 45 天, 检测到注射 KD ($15.41 \text{ ng}/\mu\text{L}$) 或注射 KD+M ($12.11 \text{ ng}/\mu\text{L}$) 的幼虫血淋巴中 N-乙酰葡萄糖胺含量显著高于其它处理组和对照组 ($F = 78.011$, $df = 7$, $P < 0.05$); 其它处理和对照组未检测到乙酰葡萄糖胺, 说明菌体生长导致乙酰葡萄糖胺的含量升高。注射芽生孢子和蜕皮激素幼虫血淋巴中未检测到 N-乙酰葡萄糖胺, 可能是由于注射蜕皮激素严重干扰体内菌体生长, 导致 N-乙酰葡萄糖胺未检测到。

2.3.6 葡萄糖 处理后的第 3 天时, 未注射幼虫的葡萄糖含量显著高于其它组别的含量 ($F = 5.678$, $df = 7$, $P < 0.05$), 说明对幼虫做注射处理可能导致葡萄糖含量降低。处理后第 45 天, 仅注射芽生孢子的幼虫的葡萄糖含量显著低于其它组别 ($F = 5.678$, $df = 7$, $P < 0.05$), 这可能是单纯注射芽生孢子的幼虫消耗葡萄糖最多或合成的葡萄糖最少。

2.3.7 海藻糖 处理后第 3 天时, 注射 PBS 的幼虫血淋巴海藻糖含量显著低于未注射对照的幼虫的 ($F = 2.591$, $df = 7$, $P < 0.05$)。处理后第 45 天, 幼虫携菌与否似乎未显著影响其血淋

巴中海藻糖的含量。

2.3.8 一氧化氮 处理后第 0 天、第 3 天时,不同处理组之间一氧化氮含量没有显著性差异 ($F=0.855$, $df=7$, $P=0.532>0.05$), 第 45 天不同处理组之间的一氧化氮含量均未发生显著变化 ($F=1.029$, $df=7$, $P=0.133>0.05$)。

3 结论与讨论

通过比较注射冬虫夏草菌芽生孢子以及同时或单独注射 20E 和甲氧普林的小金蝠蛾幼虫的存活率、僵虫率、血淋巴和肠道微生物菌群,以及注射后不同时段幼虫血淋巴中的主要化学物质含量,为探讨昆虫激素、冬虫夏草菌与寄主蝠蛾幼虫的交互作用提供数据。同时,为有效提高冬虫夏草人工培育过程中的幼虫僵化率,了解昆虫、真菌与昆虫激素的交互作用提供了参考。

本研究结果表明,注射 KD+M 可显著提高小金蝠蛾幼虫的僵虫率,注射 KD+20E 却严重抑制血淋巴中芽生孢子的生长。同时注射芽生孢子和昆虫激素影响幼虫血淋巴中的可培养微生物种类,蜕皮激素增加细菌种类而甲氧普林增加真菌种类;更多细菌种类出现在注射 KD+20E 的幼虫血淋巴中,更多真菌出现于注射 KD+M 的幼虫血淋巴。小金蝠蛾幼虫血淋巴中存在法尼醇,注射芽生孢子和昆虫激素未显著改变血淋巴中法尼醇的含量。幼虫血淋巴和芽生孢子均可产生麦角甾醇,注射蜕皮激素干扰体内菌体生长导致麦角甾醇含量偏低。注射芽生孢子和昆虫激素未显著改变幼虫血淋巴中蜕皮激素含量,但注射芽生孢子、蜕皮激素和甲氧普林均在测定时间内提升蝠蛾幼虫血淋巴内保幼激素含量。N-乙酰葡萄糖胺仅在出现芽生孢子的血淋巴中检测到。幼虫携菌与否未见其血淋巴中海藻糖的含量具显著影响。

像玉米黑穗菌和白色念珠菌等真菌一样,冬虫夏草菌也是典型的二态型真菌 (Liu *et al.*, 2019, 2020)。Liu 等 (2019) 报道,高浓度的 20E ($2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在体外显著提高冬虫夏草芽生孢子的菌丝转化率,保幼激素 (I-III 型和甲氧普林) 却未能促进芽生孢子转化为菌丝。本研究

结果表明,尽管注射 KD+20E 严重抑制幼虫血淋巴中芽生孢子的生长,但其幼虫僵虫率与注射芽生孢子的处理之间未呈现显著差异,说明僵虫率与幼虫血淋巴中芽生孢子数量并非正相关;注射 KD+M 却可显著提高小金蝠蛾幼虫的僵虫率。不同的结果可能与昆虫体内外测定系统、昆虫激素浓度以及芽生孢子状态的有关。

昆虫病原真菌在抑制昆虫免疫系统过程中可通过下调中肠中的抗菌肽和双氧化酶表达从而紊乱肠道菌群,导致肠道致病菌进入昆虫血淋巴,加速寄主死亡 (Wei *et al.*, 2017)。冬虫夏草菌的芽生孢子进入蝠蛾幼虫血淋巴后能够逃逸昆虫的免疫系统、适应血淋巴的环境生长 (Liu *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020)。本研究结果表明,仅少量可培养微生物存在于未注射 (3 种细菌和 1 种真菌)、注射 PBS (5 种细菌和 2 种真菌)、35% DMSO (仅 2 种细菌)、20E (5 种细菌和 1 种真菌) 或甲氧普林 (7 种细菌和 3 种真菌) 的小金蝠蛾幼虫血淋巴中,但是,注射芽生孢子 (16 种细菌和 1 种真菌)、KD+20E (13 种细菌和 1 种真菌) 或 KD+M (5 种细菌和 5 种真菌) 显著增加血淋巴中的细菌或真菌种类,尤其是 45 d 后;同时,幼虫血淋巴中出现的几乎所有微生物种类 (除了细菌 *Micrococcus* sp. 和真菌 *Aspergillus* sp., 和 *T. irritans* 外) 都存在于幼虫肠道中 (表 2)。可能注射芽生孢子后肠道微生物向血淋巴转移,也可能是这些微生物本来存在于血淋巴中,只是浓度太低,未能通过可培养方法检测到,但芽生孢子和昆虫激素诱导其大量生长。这与 Wu 等 (2020) 报道的结果一致。如果肠道微生物向幼虫血淋巴转移,这些微生物为何和如何从肠道向血淋巴转移仍未明了。

蜕皮激素调节免疫反应机理研究表明,在果蝇中 20E 调控 IMD 信号转导途径以增强下游抗菌肽基因的表达 (Rus *et al.*, 2013), 但飞蝗中 20E 通过激活 Toll 信号通路调控体液免疫反应 (Han *et al.*, 2017)。真菌和革兰氏阳性细菌激活 Toll 通路,而革兰氏阴性细菌诱导 IMD 通路 (Chang *et al.*, 2021)。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中,抗菌肽 (AMPs) 分为 7 组,

drosomycin、metchnikowin 和 defensin 对真菌和革兰氏阳性细菌有效, 而 cecropin 和 dipterin 对革兰氏阴性细菌有效 (Zhang and Gallo, 2016)。本研究发现, 注射 KD+20E 有利于肠道细菌出现于血淋巴中, 因为幼虫血淋巴中获得细菌的种类较多 (细菌 13 种、真菌 1 种); 而注射 KD+M 有利于肠道真菌出现于血淋巴中, 幼虫血淋巴中获得真菌的种类较多 (细菌和真菌各 5 种), 说明小金蝠蛾血淋巴中的微生物群落不仅受到冬虫夏草菌的诱导, 还被昆虫激素调控。这可能与 2 种激素对昆虫免疫的抑制作用不同有关, 注射蜕皮激素侧重于激发小金蝠蛾抑制真菌的免疫作用, 而注射甲氧普林激发这一昆虫抑制细菌的免疫通路。注射 KD+M 的幼虫僵化率最高, 从幼虫肠道转移到血淋巴中的 2 种特异真菌 (*Aspergillus* sp. 和 *Penicillium capsulatum*) 是否在芽生孢子向菌丝转化方面发挥作用值得进一步研究。注射 KD 后 45 d, 即使幼虫肠道微生物向血淋巴转移, 冬虫夏草菌芽生孢子在血淋巴中浓度也很高, 但小金蝠蛾幼虫仍能存活, 其原因值得继续研究。

昆虫血淋巴是多样信号物质库。在未注射的幼虫中, 除了未检测到 N-乙酰葡萄糖胺和酪醇, 法尼醇、麦角甾醇、蜕皮激素、保幼激素、葡萄糖、海藻糖、一氧化氮均检测到。N-乙酰葡萄糖胺是真菌的体壁组分之一, 既在冬虫夏草菌液中出现 (未发表数据), 也在含芽生孢子的小金蝠蛾幼虫血淋巴中检测到。注射 KD+20E 的小金蝠蛾幼虫血淋巴中均未检测到 N-乙酰葡萄糖胺, 这可能是由于 20E 影响芽生孢子生长所致。冬虫夏草菌液中可检测到酪醇 (未发表数据), 但本实验携带芽生孢子的幼虫血淋巴中未检测出酪醇, 可能原因是酪醇在血淋巴中处于痕量水平, 或血淋巴中存在分解和消耗酪醇的酶。与 3 组对照相比, 注射芽生孢子和昆虫激素未显著改变血淋巴中法尼醇、蜕皮激素、海藻糖、一氧化氮的含量; 但注射 KD、KD+20E、KD+M 3 d 和 45 d 时可提升幼虫血淋巴的保幼激素含量, 说明芽生孢子刺激蝠蛾幼虫提升保幼激素滴度。为何注射 20E 和 5M 也可导致 45 d 时保幼激素含量升高仍

未清楚。据报道, 纳卡变形微孢子虫 *Vairimorpha necatrix* 侵染番茄蛾 *Lacanobia oleracea* 幼虫后, 提高幼虫血淋巴中的保幼激素滴度, 延长发育时间, 便于微孢子成熟 (Down *et al.*, 2008)。冬虫夏草芽生孢子可在小金蝠蛾幼虫血淋巴中生长几个月, 保幼激素滴度的提升可能有利于保存幼虫状态, 便于芽生孢子的生长。但芽生孢子如何刺激蝠蛾幼虫提高保幼激素滴度仍需继续研究。

研究表明, 20E 参与了昆虫病原侵染寄主昆虫的互作过程。白僵菌接种大蜡螟幼虫 4 d 时, 幼虫血淋巴中的 20E 浓度高于对照组 32.9%, 用于激发昆虫免疫系统抑制病原真菌 (冯雪瑶, 2017)。另一方面, 有些病原菌为了阻止昆虫蜕皮、发育及由蜕皮激素引发的免疫作用, 分泌一些酶氧化和失活蜕皮激素, 如杆状病毒表达的蜕皮类固醇 UDP-葡萄糖基转移酶失活蜕皮激素 (O'Reilly and Miller, 1989)。昆虫病原真菌也能产生关键酶以降解昆虫血淋巴的蜕皮激素, 降低昆虫的免疫反应, 有利于真菌在血淋巴中的快速定殖, 如莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi* 能分泌蜕皮酮-22-氧化酶 (E22O), 特异性将蜕皮酮 C22 上的羟基氧化成羰基, 失活蜕皮激素 (Kamimura *et al.*, 2012)。黑腹果蝇中的 *CYP18A1* 酶通过羟基化作用失活 20E (Guittard *et al.*, 2011)。本实验结果也证明蜕皮激素对小金蝠蛾免疫的激发作用以及冬虫夏草菌对蝠蛾幼虫血淋巴蜕皮激素浓度的抑制作用。注射 KD+20E 导致血淋巴中的芽生孢子生长受阻, 主要表现在血淋巴中孢子数量很少, 孢子产生的 N-乙酰葡萄糖胺和酪醇未检测到, 麦角甾醇含量偏低。这进一步证明注射蜕皮激素激发小金蝠蛾抑制真菌的免疫作用, 尽管蜕皮激素如何诱导和利用昆虫免疫系统抑制冬虫夏草芽生孢子的生长仍有待详细研究。另一方面, 注射芽生孢子后 3 d 或 45 d, 幼虫血淋巴中的蜕皮激素未显著升高, 表明真菌可能参与抑制蜕皮激素合成或迅速分解这一激素。冬虫夏草菌基因组中未存在蜕皮酮-22-氧化酶基因 (Ecdysteroid-22-oxidase) 但存在 *CYP18A1* 基因 (未发表数据), 说明冬虫夏草菌可能利用其它酶参与蜕皮激素代谢。

致谢: 感谢何美裕协助完成菌株鉴定, 梁静协助分析血淋巴化学物质, 在此致以衷心的感谢!

参考文献 (References)

- Beckstead RB, Lam G, Thummel CS, 2005. The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila metamorphosis*. *Genome Biology*, 12(6): R99.
- Cao L, Han RC, 2015 Artificial cultivation of host insects of *Ophiocordyceps sinensis* in low altitude areas. China. ZL201410413333.7. 2015-08. [曹莉, 韩日畴, 2015. 一种冬虫夏草寄主昆虫蝙蝠蛾的人工低海拔饲养方法. 中国. ZL201410413333.7. 2015-08.]
- 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): 1017–1022.
- Cao L, Liu GQ, Wu H, Han RC, 2021. A method for obtaining Chinese cordyceps by infecting host insect *Hepidia* larvae with *Ophiocordyceps sinensis*. China, ZL201910176984.1. 2021-06. [曹莉, 刘桂清, 吴华, 韩日畴, 2021. 一种中国被毛袍感染寄主昆虫蝙蝠蛾幼虫获得冬虫夏草的方法. 中国, ZL201910176984.1. 2021-06.]
- Chai LQ, Miao YC, Wang L, 2015. The effects of 20-hydroxyecdysone on lottonbollworm immune system. *Sichuna Journal of Zoology*, 34(5): 739–747. [柴连琴, 苗迎春, 王乐, 2015. 20-羟基蜕皮酮对棉铃虫免疫系统的影响. 四川动物, 34(5): 739–747.]
- Chang MM, Wang YH, Yang QT, Wang XL, Wang M, Raikhel A, Zou Z, 2021. Regulation of antimicrobial peptides by juvenile hormone and its receptor, methoprene-tolerant, in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 128: 103509.
- Chen WR, Ye ML, Wei YS, 2015. A method for improving the infection rate of the host insects by *Ophiocordyceps sinensis* fungus. China, ZL201510281868. 2015-08. [陈威仁, 叶美良, 魏钰珊, 2015. 提高冬虫夏草寄主感染率的方法. 中国, ZL201510281868. 2015-08.]
- Desai J, 2018. *Candida albicans* hyphae: From growth initiation to invasion. *Journal of Fungi*, 4(1): 10.
- Dong XF, 2019. Determination of ergosterol in Fermented *Cordyceps sinensis* mycelial powder by HPLC. *Modern Food*, 2019(18): 154–157. [董笑菲, 2019. HPLC 法测定发酵冬虫夏草菌丝粉中麦角甾醇的含量. 现代食品, 2019(18): 154–157.]
- Down RE, Bell HA, Bryning G, Kirkbride-Smith AE, Edwards JP, Weaver RJ, 2008. Infection by the microsporidium *Vairimorpha necatrix* (Microspora: Microsporidia) elevates juvenile hormone titres in larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(3): 223–229.
- Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5): 699–735.
- Feng XY, 2017. Inactivation of ecdysis hormone 20E enhances the infection efficiency of *Beauveria bassiana*. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [冯雪瑶, 2017. 通过失活昆虫蜕皮激素 20E 提高球孢白僵菌的侵染效率. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Flatt T, Heyland A, Rus F, Porpiglia E, Sherlock C, Yamamoto R, Garbuzov A, Palli SR, Tatar M, Silverman N, 2008. Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 211(16): 2712–2724.
- Franssens V, Smaghe G, Simonet G, Claeys I, Breugelmans B, De Loof A, Vanden BJ, 2006. 20-Hydroxyecdysone and juvenile hormone regulate the laminarin-induced nodulation reaction in larvae of the flesh fly, *Neobellieria bullata*. *Developmental & Comparative Immunology*, 30(9): 735–740.
- Gauthier GM, 2015. Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. *PLoS Pathogens*, 11(2): e1004608.
- Ghosh S, Kebaara BW, Atkin AL, Nickerson KW, 2008. Regulation of aromatic alcohol production in *Candida albicans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23): 7211–7218.
- Guittard E, Blais C, Maria A, Parvy JP, Pasricha S, Lumb C, Lafont R, Daborn P, Dauphin-Villemant C, 2011. CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. *Developmental Biology*, 349(1): 35–45.
- Han PF, Han J, Fan JQ, Zhang M, Enbo M, Li S, Fan RJ, Zhang JZ, 2017. 20-Hydroxyecdysone activates PGRP-SA mediated immune response in *Locusta migratoria*. *Developmental and Comparative Immunology*, 72: 128–139.
- Han RC, Wu H, Tao HP, Qiu XH, Liu QQ, Rao ZC, Cao L, 2019. Research on Chinese cordyceps during the past 70 years in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(5): 849–883. [韩日畴, 吴华, 陶海平, 丘雪红, 刘桂清, 饶中臣, 曹莉, 2019. 中国冬虫夏草研发 70 年. 应用昆虫学报, 56(5): 849–883.]
- Han TL, Cannon RD, Villas-Bôas SG, 2011. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genetics and Biology*, 48(8): 747–763.
- Hepat R, Kim Y, 2014. JH modulates a cellular immunity of *Tribolium castaneum* in a Met-independent manner. *Journal of Insect Physiology*, 63(1): 40–47.
- Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW, 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7): 2982–2992.
- Hu L, Guo B, Wang L, Lu H, Chen XM, 2004. Method of GC-MS and capillary gas chromatography for determining trehalose in plant tissues. *Plant Physiology Communications*, 40(4): 474–478. [胡磊, 郭蓓, 王乐, 陆海, 陈雪梅, 2004. 分析植物组织中海藻糖的气质联用及毛细管气相色谱法. 植物生理学通讯, 40(4): 474–478.]
- Kamimura M, Saito H, Niwa R, Niimi T, Toyoda K, Ueno C, Kanamori Y, Shimura S, Kiuchi M, 2012. Fungal ecdysteroid-

- 22-oxidase, a new tool for manipulating ecdysteroid signaling and insect development. *Journal of Biological Chemistry*, 287(20): 16488–16498.
- Kijpornyongpan T, Aime MC, 2020. Investigating the smuts: Common cues, signaling pathways, and the role of MAT in dimorphic switching and pathogenesis. *Journal of Fungi*, 6(4): 368.
- Kwong WK, Moran NA, 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6): 374–384.
- Kwon S, Kim Y, 2007. Immunosuppressive action of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, enhances pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: yponomeutidae). *Biological Control*, 42(1): 72–76.
- Lei W, Zhang GR, Peng QY, Liu X, 2015. Development of *Ophiocordyceps sinensis* through plant-mediated interkingdom host colonization. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8): 17482–17493.
- Li WJ, Dong CH, Liu XZ, Li QP, Xia JM, Liang L, 2016. Research advances in artificial cultivation of Chinese cordyceps. *Mycosystema*, 35(4): 375–387. [李文佳, 董彩虹, 刘杏忠, 李全平, 夏金明, 梁蕾, 2016. 冬虫夏草培植技术研究进展. 菌物学报, 35(4): 375–387.]
- Li WJ, Xia JM, Li QP, Zhang ZY, Zhang WW, Dong CH, Wei JC, Liu XZ, 2020. Developmental recording of the ghost moth larvae after ex situ infection by *Ophiocordyceps sinensis*. *Science China Life Sciences*, 63(7): 1093–1095.
- Li X, Liu Q, Li WJ, Li QP, Qian ZM, Liu XZ, Dong CH, 2019. A breakthrough in the artificial cultivation of Chinese *Cordyceps* on a large-scale and its impact on science, the economy and industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(2): 181–191.
- Liao ZY, 2005. Study on bacterial contamination of *Cordyceps sinensis*. *Edible Fungi*, 27(6): 18. [廖志勇, 2005. 冬虫夏草的细菌技术研究. 食用菌, 27(6): 18.]
- Liang HH, Cheng Z, Yang XL, Li S, Ding ZQ, Zhou TS, Zhang WJ, Chen JK, 2008. Genetic diversity and structure of *Cordyceps sinensis* populations from extensive geographical regions in China as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *The Journal of Microbiology*, 46(5): 549–556.
- Liang Y, Hong YH, Mai ZH, Zhu Q, Guo L, 2019. Internal and external microbial community of the *Thitarodes* moth, the host of *Ophiocordyceps sinensis*. *Microorganisms*, 7(11): 517.
- Liu L, Wang ZK, Yu HW, Chen SJ, Yan GF, Xia YX, Yin YP, 2008. Analysis of the bacterial diversity in intestines of *Hepialus gonggaensis* larvae. *Acta Microbiologica Sinica*, 48(5): 616–622. [刘莉, 王中康, 俞和韦, 陈仕江, 阎光凡, 夏玉先, 殷幼平, 2008. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析. 微生物学报, 48(5): 616–622.]
- Liu GQ, Han RC, Cao L, 2019. Artificial cultivation of the Chinese cordyceps from injected ghost moth larvae. *Environmental Entomology*, 48(5): 1088–1094.
- Liu GQ, Cao L, Qiu XH, Han RC, 2020. Quorum sensing activity and hyphal growth by external stimuli in the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps sinensis*. *Insects*, 11(4): 205.
- Lu ZH, Shi P, He YC, Zhang DL, He ZY, Chen SJ, Tu YQ, Li L, Liu F, Zeng W, 2015. Review on natural enemies and diseases in the artificial cultivation of Chinese caterpillar mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(7): 693–700.
- Matsui H, Kakei M, Iwami M, Sakurai S, 2011. Glucose oxidase prevents programmed cell death of the silkworm anterior silk gland through hydrogen peroxide production. *The FEBS Journal*, 278(5): 776–785.
- O'Reilly DR, Miller LK, 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science*, 245(4922): 1110–1112.
- Qian MH, Ren SX, Hu QB, 2006. Effects of endoparasitism by *Encarsia bimaculata* on the titers of juvenile hormones and 20-hydroxyecdysone in *Bemisia tabaci* nymphs. *Acta Entomologica Sinica*, 49(4): 568–573. [钱明惠, 任顺祥, 胡琼波, 2006. 双斑恩蚜小蜂寄生对烟粉虱体内保幼激素和 20-羟基蜕皮酮含量的影响. 昆虫学报, 49(4): 568–573.]
- Qin QL, Zhou GL, Zhang H, Meng Q, Zhang JH, Wang HT, Miao L, Li X, 2018. Obstacles and approaches in artificial cultivation of Chinese cordyceps. *Mycology*, 9(1): 7–9.
- Qiu XH, Cao L, Han RC, 2016. The progress, issues and perspectives in the research of *Ophiocordyceps sinensis*. *Journal of Environmental Entomology*, 38(1): 1–22. [丘雪红, 曹莉, 韩日畴, 2016. 冬虫夏草的研究进展、现存问题与研究展望. 环境昆虫学报, 38(1): 1–22.]
- Rantala MJ, Vainikka A, Kortet R, 2003. The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: A test of the immunocompetence handicap principle. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1530): 2257–2261.
- Rantala MJ, Dubovskiy IM, Pölkki M, Krama T, ContrerasGarduño J, Krams IA, 2020. Effect of juvenile hormone on resistance against entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* differs between sexes. *Journal of Fungi*, 6(4): 298.
- Rus F, Flatt T, Tong M, Aggarwal K, Okuda K, Kleino A, Yates E, Tatar M, Silverman N, 2013. Ecdysone triggered PGRP-LC expression controls *Drosophila* innate immunity. *EMBO Journal*, 32(32): 1626–1638.
- Schwenke RA, Lazzaro BP, 2017. Juvenile hormone suppresses resistance to infection in mated female *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, 27(4): 596–601.
- Shen NY, Zeng L, Zhang XZ, Shan Z, Wei SL, Zhou ZR, 1983. The isolation of *Cordyceps sinensis*. *Edible Fungi*, 1983(5): 1–5. [沈南英, 曾璐, 张显趾, 善智, 魏世录, 周中蓉, 1983. 冬虫夏草真菌的分离. 食用菌, 1983(5): 1–5.]
- Sorrentino RP, Carton Y, Govind S, 2002. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Developmental Biology*, 243(1): 1–11.

- 65–80.
- Tao Z, Cao L, Zhang Y, Ye YS, Han RC, 2016. Laboratory rearing of *Thitarodes armoricanus* and *Thitarodes jianchuanensis* (Lepidoptera: Hepialidae), hosts of the Chinese medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae). *Journal of Economic Entomology*, 109(1): 176–181.
- Tian L, Guo E, Diao Y, Zhou S, Peng Q, Cao Y, Erjun L, Li S, 2010. Genome-wide regulation of innate immunity by juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone in the bombyxi fat body. *BMC Genomics*, 11(1): 549.
- Tu YQ, Zhang DL, Zeng W, Chen SJ, Yin DH, 2010. An experiment of infecting *Hepialus* larvae with *Cordyceps sinensis*. *Edible Fungi*, 32(3): 16–17. [涂永勤, 张德利, 曾伟, 陈仕江, 尹定华, 2010. 蝠蛾属幼虫感染冬虫夏草菌的实验研究. 食用菌, 32(3): 16–17.]
- Tu YQ, Zhu HL, Zhang DL, Chen SJ, 2012. Different strains of *Cordyceps sinensis* on infectivity of host larvae. *Edible Fungi of China*, 31(5): 32–34. [涂永勤, 朱华李, 张德利, 陈仕江, 2012. 不同产地冬虫夏草菌对寄主幼虫侵染力研究. 中国食用菌, 31(5): 32–34.]
- Wang J, Higgins VJ, 2005. Nitric oxide has a regulatory effect on the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(4): 284–292.
- Wang MP, 2010. A method for artificial cultivation of Chinese cordyceps. China, ZL201010604460. 2010-07. [王梅平, 2010. 一种全人工培养冬虫夏草的方法. 中国, ZL201010604460. 2010-07.]
- Wang Q, 2013. Effects of nitric oxide on the growth, development and pathogenicity of postharvest pathogen *Botrytis cinerea*. Master dissertation. Anhui: Anhui Agricultural University. [王倩, 2013. 一氧化氮对采后病原真菌 *Botrytis cinerea* 的生长发育影响及机制研究. 硕士学位论文. 安徽: 安徽农业大学.]
- Wang Z, Ma QL, Qiao ZQ, 2001. Study on the isolation culture of *Cordyceps sinensis* (Berkeley) Saccardo in Gansu province. *Gansu Agricultural Science and Technology*, (7): 43–44. [王忠, 马启龙, 乔正强, 2001. 甘肃冬虫夏草菌分离培养研究. 甘肃农业科技, (7): 43–44.]
- Wei G, Lai YL, Wang GD, Chen H, Li F, Wang SB, 2017. Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(23): 5994–5999.
- Wu H, Cao L, Rao ZC, Cao L, De Clercq P, Han RC, 2020. Infection of *Ophiocordyceps sinensis* fungus causes dramatic changes in the microbiota of its *Thitarodes* host. *Frontiers in Microbiology*, 11: 577268.
- Xia F, Liu Y, Shen GR, Guo LX, Zhou XW, 2015. Investigation and analysis of microbiological communities in natural *Ophiocordyceps sinensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(2): 104–111.
- Xia F, Chen X, Guo MY, 2016. High-throughput sequencing-based analysis of endogenetic fungal communities inhabiting the Chinese *Cordyceps* reveals unexpectedly high fungal diversity. *Scientific Reports*, 6(1): 33437.
- Yu HW, Wang ZK, Liu L, Xia YX, Yin YP, Yuan Q, Cao YQ, Peng GX, 2008. Analysis of the fungal diversity in intestines of *Hepialus gonggaensis* larvae. *Acta Microbiologica Sinica*, 48(5): 616–622. [俞和韦, 王中康, 刘莉, 夏玉先, 殷幼平, 袁青, 曹月青, 彭国雄, 2008. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌多样性分析. 微生物学报, 48(5): 616–622.]
- Zhang LJ, Gallo RL, 2016. Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1): R14–R19.
- Zhang S, Zhang YJ, Shrestha B, Xu JP, Wang CS, Liu XZ, 2013. *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*: Research advances, issues and perspectives. *Mycosystema*, 32(4): 577–597. [张姝, 张永杰, Shrestha B, 徐建平, 王成树, 刘杏忠, 2013. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望. 菌物学报, 32(4): 577–597.]
- Zhang YJ, Xu LL, Zhang S, Liu XZ, An ZQ, Wang M, Guo YL, 2009. Genetic diversity of *Ophiocordyceps sinensis*, a medicinal fungus endemic to the Tibetan Plateau: Implications for its evolution and conservation. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1): 290.
- Zhang YJ, Zhang S, Wang M, Bai FY, Liu XZ, 2010. High diversity of the fungal community structure in naturally-occurring *Ophiocordyceps sinensis*. *PLoS ONE*, 5(12): e15570.
- Zhao J, Xie J, Wang LY, Li SP, 2013. Advanced development in chemical analysis of *Cordyceps*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87(1434): 271–289.
- Zhong X, Liu X, He JM, 2015. A fungal preparation and method for infecting the ghost moth larve by *Ophiocordyceps sinensis* fungus. China, ZL201410541471. 2015-03. [钟欣, 刘昕, 何健敏, 2015. 一种冬虫夏草菌种材料的制备及侵染钩蝠蛾幼虫的方法. 中国, ZL201410541471. 2015-03.]
- Zhou XW, Li LJ, Tian EW, 2013. Advances in research of the artificial cultivation of *Ophiocordyceps sinensis* in China. *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(3): 233–243.
- Zhu LB, Wang Y, Yan RM, Zhang ZB, Zhu D, 2017. Advances in dimorphism transition in fungi. *Microbiology China*, 44(11): 2722–2733. [祝丽彬, 汪涯, 颜日明, 张志斌, 朱笃, 2017. 二型态真菌形态调控研究现状与展望. 微生物学通报, 44(11): 2722–2733.]
- Zhu WX, Wang D, Liu T, Yang Q, 2016. Production of N-Acetyl-d-glucosamine from mycelial waste by a combination of bacterial chitinases and an insect N-Acetyl-D-glucosaminidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(35): 6738–6744.
- Zhuo FP, Chen SJ, Yin, YP, Wang ZK, Xia YX, 2004. Analysis on the *Hepialus gonggaensis*' intestinal bacterial flora. *Journal of Chongqing University (Natural Science Edition)*, 27(11): 26–29. [卓凤萍, 陈仕江, 殷幼平, 王中康, 夏玉先, 2004. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道菌群的分析. 重庆大学学报(自然科学版), 27(11): 26–29.]