

文章编号: 0529-6579 (2000) 04-0070-04

虫草属多元起源的分子生物学证据^{*}

王 宁¹, 陈月琴¹, 章卫民², 李泰辉², 屈良鹄¹

(1. 中山大学生物工程研究中心, 广东 广州 510275; 2. 广东省微生物研究所)

摘 要: 测定了虫草属 (*Cordyceps*) 代表种及其相关无性型菌 (anamorphic state) 核糖体 rDNA ITS 区序列, 并从国际分子生物学数据库中调取相关序列, 以 PhyIip35 分析软件构建序列距离矩阵和分子系统发育树图, 结果表明: 虫草属各个种之间 ITS 区序列差别比较大, 不能形成一个单系的类群。冬虫夏草, 古尼虫草, 蛹虫草, 大团囊虫草在系统发育上分别与丝孢纲 (Hyphomycetes), 束梗孢目 (Stilbelaes) 的中国被毛孢, 丝孢目 (Hyphomycetales) 的黄绿绿僵菌, 丝孢目 (Hyphomycetales) 的球孢白僵菌, 担子菌纲的 *Cyphomyrmex minutus* 非常接近, 在树图上分别处于相对独立的分支; 说明形态学上划分的虫草属并非一自然发生的类群, 也说明了虫生真菌形态与基因水平进化的不一致性。

关键词: 虫草属 (*Cordyceps*); rDNA ITS 区; 多元起源

中图分类号: Q949.9; Q7 **文献标识码:** A

虫草属 (*Cordyceps*) 是一类虫生真菌, 分类学上属于子囊菌亚门 (Ascomycotina) 核菌纲 (Pyrenomycetes) 麦角菌目 (Clavicipitales), 包含许多珍稀的药用种类, 其中以冬虫夏草为代表, 辅以古尼虫草, 蛹虫草等替代品, 日渐受到人们的青睐并广泛地应用于医疗保健事业。随着人们对虫草药用价值和生物学意义的普遍关注, 对虫草属各种类的正确识别与分类已成为目前有关虫草属研究方面的主要问题之一。

然而虫草属大多数种类生长于海拔 3 500 ~ 5 000 m 的高山灌丛草甸和高寒草甸带或热带雨林, 标本采集比较困难; 加上虫草属寄主种类多样, 有昆虫, 蜘蛛和某些真菌菌核等, 造成了该属种类形态多样; 另外, 虫草属又是一类复型真菌, 在它们的生活史中有分生孢子阶段 (无性型 anamorph) 和子囊孢子阶段 (有性型 teleomorph)^[1], 生活史的复杂性和形态多样性使得虫草属种的鉴定和分类非常困难, 目前尚未有该属系统学分析的报道, 属内各个种之间亲缘关系的研究更难提到日程上来。基于对冬虫夏草有性型和无性型的研究^[2], 核糖体基因转录间隔区 (internal transcribed spaces, ITS) 是虫草属内种的鉴定良好的分子指标, ITS 区序列在各个种之间的变化体现了种间差异的大小。本研究选择虫草属几个常见代表种作为分析材料, 以 ITS 区为分子指标, 测定其序列, 并与国际数据库中已

^{*} 基金项目: 国家杰出青年基金资助项目 (39525007); 国家自然科学基金资助项目 (39770058)

收稿日期: 1999-12-23; 作者简介: 王 宁 (1976~), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 陈月

琴

知数据进行比较分析, 确定虫草属内种之间的系统发育关系, 从 DNA 水平探讨虫草属的演化, 进而探索虫生真菌形态与分子进化的机制.

1 材料与方法

1.1 材 料

本研究采用的材料, 冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 和古尼虫草 (*Cordyceps gunnii*) 由广东省微生物研究所李泰辉分别采自海拔 3 500 m 以上的西藏高原和广东鼎湖山; 中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 是由北京微生物研究所郭英兰从天然冬虫夏草分离培养得到的无性型菌; 蛹虫草 (*Cordyceps militaris*), 大团囊虫草 (*Cordyceps ophioglossoides*), 黄绿绿僵菌 (*Metarhizjum flavovirde* var. type E), 球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana* Vuill) 和 *Cyphomyrmex minutus* 等序列从国际分子生物学数据库中获得. 材料及数据来源, 分类学位置, 数据库收录号见表 1.

表 1 材料名称, 来源, 缩写, GenBank 收录号

Tah 1 The species used in this study, their origin, abbreviation and GenBank accession number

种 名	分类单元(所属目)	缩写	收录号
冬虫夏草(<i>Cordyceps sinensis</i>)	麦角菌目(Clavicipitales)	<i>C. sin</i>	AJ245559
古尼虫草(<i>Cordyceps gunnii</i>)	麦角菌目(Clavicipitales)	<i>C. gun</i>	AJ243772
中国被毛孢(<i>Hirsutella sinensis</i>)	束梗孢目(Stilbelaes)	<i>H. sin</i>	AJ243979
蛹虫草(<i>Cordyceps militaris</i>)	麦角菌目(Clavicipitales)	<i>C. mil</i>	AF122037
大团囊虫草(<i>Cordyceps ophioglossoides</i>)	麦角菌目(Clavicipitales)	<i>C. oph</i>	AF122035
黄绿绿僵菌(<i>Metarhizjum flavovirde</i>)	丝孢目(Hyphomycetales)	<i>M. fla</i>	AF139855
球孢白僵菌(<i>Beauveria bassiana</i>)	丝孢目(Hyphomycetales)	<i>B. bas</i>	BBU18949
<i>Cyphomyrmex minutus</i>	担子菌亚门, 伞菌目(Agaricales)	<i>C. min</i>	AF079689

1.2 方 法

1.2.1 DNA 的提取 采用 CTAB 法^[3] 提取总 DNA, 采用 DPS(玻璃粉)纯化系统纯化, -20℃保存备用.

1.2.2 目的基因片段的 PCR 扩增及序列测定 使用真核生物通用引物 LH2/D1a 扩增目的片段, 引物序列及位置, PCR 反应程序见参考文献[2]. PCR 产物用 PCR 纯化试剂盒纯化(QIAGEN, Gemany), 取 1 μL 于 ρ=1% Agrose 凝胶电泳检察, 纯化后的 PCR 产物使用引物 IH2/D1a, DNA 全自动测序仪(Perkin Elmer 377)直接进行序列测定.

1.2.3 数据处理 利用 Pcgene6.0 分析软件将序列进行排序, 序列间引入适当的空格, 以达到最大同源性; 使用 Phylip35 分析软件包 DNAdist 程序, 按照 Kimura^[4] 公式, 建立距离矩阵, 分别用 NJ, Fitch 方法建立各个种之间的系统发育关系, 应用 Bootstrap 检验系统树, 自展数据为 100 次. 以 *Acaulospora trappei* 为外类群.

2 结果与讨论

分别测得冬虫夏草的子囊孢子 (*C. sinb*), 菌核 (*C. sinc*), 子座 (*C. sinz*) 以及古尼虫草, 中国被毛孢 ITS 区全部序列, 分别为 495, 495, 495, 575, 506 bp, 其中, ITS1 分别为 162, 162,

161, 213, 171 bp, 5. 8S 均为 156 bp, ITS2 分别为 177, 177, 178, 206, 179 bp.

通过 Internet 从国际分子生物学数据库中获其他种类蛹虫草, 大团囊虫草和蚁虫草及黄绿绿僵菌, 球孢白僵菌, *Cyphomyrmex minutus* ITS 区序列. 绿僵菌, 白僵菌等据报道为虫草属相关的无性型^[1]. 以 *Acaulospora trappei* 为外类群, 按照 Kimura 公式, 使用 Phylip35 分析软件包 DNAdist 程序计算各种之间的差异值(表 2). 采用 NJ 和 Fitch 构建分子系统图(如图 1), 2 种方法构建的树图基本一致.

表 2 虫草属及相关类群 ITS 区序列距离矩阵

Tab 2 Kimura sequence divergence values of taxa in *Cordyceps* and it's ourgroup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <i>C. sin c</i>	0. 0000	0. 0150	0. 0067	0. 2165	0. 2553	0. 0050	0. 2727	0. 25 10	0. 5323	0. 7207	0. 7105
2 <i>C. sin b</i>		0. 0000	0. 0151	0. 2183	0. 2571	0. 0167	0. 2812	0. 25 99	0. 5283	0. 7253	0. 7070
3 <i>C. sin z</i>			0. 0000	0. 2171	0. 2561	0. 0050	0. 2743	0. 25 25	0. 5176	0. 7087	0. 7172
4 <i>C. mil</i>				0. 0000	0. 0592	0. 2142	0. 2396	0. 22 32	0. 4641	0. 6659	0. 7153
5 <i>B. bas</i>					0. 0000	0. 2529	0. 2522	0. 26 93	0. 4909	0. 6899	0. 7133
6 <i>H. sin</i>						0. 0000	0. 2699	0. 24 81	0. 5283	0. 7162	0. 7163
7 <i>C. gun</i>							0. 0000	0. 13 61	0. 6698	0. 8180	0. 7473
8 <i>M. fla</i>								0. 0000	0. 5856	0. 7354	0. 7605
9 <i>C. oph</i>									0. 0000	0. 14 97	0. 7923
10 <i>C. min</i>										0. 0000	0. 9543
11 <i>A. tra</i>											0. 0000

如表 2 所示, 冬虫夏草子囊孢子, 菌核, 子座 ITS 区序列差异均小于 2%, 考虑到真菌 rDNA 的多拷贝性, 尽管存在这样的差异, 仍能说明同一个体 rDNA ITS 区具有较大的一致性; 比较冬虫夏草与蛹虫草, 古尼虫草, 大团囊虫草的 ITS 区序列, 其差异分别为 21. 65%, 27. 27%, 53. 23%, 这远远超过了一般真菌属内水平的差异^[5], 蛹虫草, 古尼虫草, 和大团囊虫草之间两两比较, 它们之间的差异也都大于 20%, 有的甚至高达 50%; 而冬虫夏草与中国被毛孢, 蛹虫草和球孢白僵菌, 古尼虫草和黄绿绿僵菌, 大

团囊虫草与 *Cyphomyrmex minutus*, 序列间差异仅分别有 2%, 5. 92%, 13. 61%, 14. 97%, 自展树图(图 1)支持上述结论. 从图 1 中可看出, 冬虫夏草与中国被毛孢为一分支, 自展值为 100, 同样, 蛹虫草和球孢白僵菌, 古尼虫草和黄绿绿僵菌, 大团囊虫草与 *Cyphomyrmex minutus* 分别组成独立的分支, 自展值都高达 99 或 100%. 这表明冬虫夏草与中国被毛孢, 古尼虫草与黄绿绿僵菌, 蛹虫草与球孢白僵菌, 大团囊虫草与 *Cyphomyrmex minutus* 在系统发育上有近缘的关系, 中国被毛孢属于丝孢纲 (Hyphomycetes), 束梗孢目

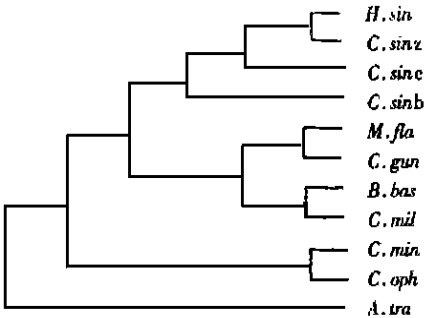


图 1 虫草属及相关类群系统发育树图

Fig. 1 Molecular phylogenetic tree of *Cordyceps* and its related species inferred from the 5.8S rDNA and ITS region with Neighbor-joining method, *A. tra* as outgroup

(*Stilbelaes*), 球孢白僵菌和黄绿绿僵菌属于丝孢纲 (*Hyphomycetes*), 丝孢目 (*Hyphomycetales*), *Cyphomymex minutus* 为层菌纲 (*Hymenomycetes*), 伞菌目 (*Agaricales*), 虫草属内不同种与这些种的相似性, 说明虫草属并非一个自然的类群. 这一结果对形态学分类意义上的虫草属提出了置疑. 寄生真菌表型特征的趋同现象而基因水平上的多样性很可能是寄生真菌为了适应寄主本身的免疫反应而产生的结果. 有关这方面的研究我们将给予进一步的报道.

参考文献:

- [1] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996.
- [2] 赵锦, 王宁, 陈月琴, 等. 冬虫夏草无性型的分子鉴别 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1999, 38 (1): 121 ~ 123.
- [3] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11 ~ 15.
- [4] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions [J]. *J Molecular Evolution*, 1980, 16: 111 ~ 120.
- [5] 屈良鹄, 陈月琴. 生物分子分类检索表——原理与方法 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1999, 38 (1): 1 ~ 5.

Molecular Evidences Indicating Multiple Origins in the Entomogenous *Cordyceps*

WANG Ning^{*}, CHEN Yue-qin, ZHANG Wei-min, LI Tai-hui, QU Liang-hu

Abstract: The nucleotide sequences of rDNA ITS and 5.8S ribosome DNA from several representative species of *Cordyceps* were determined and compared with published sequences. Based on sequence data, the phylogenetic trees were constructed using the NJ and Fitch method. Diversity in the phylogenetic tree was found for *Cordyceps* species, *C. sinensis*, *C. Militaris*, *C. gunnii*, *C. ophioglossoide* were closely related to *Hirsutella sinensis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium flavoviride*, *Cyphomymex minutus* respectively. rDNA ITS sequences analysis indicated *Cordyceps* species are not a monophyletic group, and presented new insight into traditional concepts of the genus *Cordyceps*.

Keywords: rDNA ITS; *Cordyceps*; phylogeny; multiple origins

^{*} Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China