

# 虫草属真菌经植物环节“宿主跳跃”的初步研究

林 筱<sup>1,3</sup>, 王增福<sup>1</sup>, 黄 坚<sup>1,2</sup>, 钱晓鸣<sup>1,2\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 2. 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室(厦门大学),

3. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 从酿酒葡萄(*Vitis vinifera* L.)和番荔枝(*Annona squamosa* L.)中分离并鉴定两株植物内生来源的虫草属真菌和一株拟青霉, 并就已知昆虫、块菌来源的虫草属真菌 ITS 分子序列建立了在不同宿主体内的虫草属真菌系统发育树, 重现了其物种在协同进化历程中在不同宿主体内发育的现象. 发现虫草属真菌在进化过程中除了昆虫与块菌外可能还经由植物的“宿主跳跃”环节.

**关键词:** 内生真菌; 虫草属真菌; 宿主跳跃

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2010)05-0717-04

内生生物与宿主之间的相互关系是目前内生生物研究的热点之一, 特别是植物内生真菌与其宿主之间的利益关系、作用机制. 研究表明, 植物内生真菌与其宿主之间存在专一性, 包括宿主科的水平上的专一性<sup>[1]</sup>和宿主种的水平上的专一性<sup>[2]</sup>, 甚至一些种类可以具有宿主组织的专一性<sup>[3]</sup>. 这些专一性是由内生真菌生活史特点所决定的, 为了识别并进入宿主、避免宿主免疫系统伤害、在特殊微环境下生长扩散, 内生真菌就必须有一套独特的机制来应对. 亦即内生真菌必须不断通过水平传播来存活与繁殖, 即频繁的接触并感染新的宿主, 建立新的内生关系. 所以目前我们所观察到的宿主特异性是基于下面两个因素的长期进化结果: 已存在内生关系的维持和通过随机的宿主迁移扩大生态领域<sup>[4]</sup>.

到目前为止, 有两个公认的假说来阐述内生关系及影响其形成的因素, “宿主关系假说”<sup>[4]</sup>和“宿主环境假说”<sup>[5]</sup>. 前一观点认为“宿主迁移”方向依赖于宿主的品系, 这能解释为什么一些较低分类水平上相关的宿主拥有相似的内生生物群落; 后一观点认为“宿主迁移”方向依赖于宿主所能提供的微生态环境和营养环境, 此观点能解释为什么经常发现一些较高分类水平上不相关的宿主拥有比较相似的内生生物群落.

由于“宿主迁移”都是发生在长期的进化史中, 人

们很难具体重建此过程. 但“基因水平传递”<sup>[6]</sup>及“内共生理论”<sup>[7]</sup>认为由于在长期的进化中, 宿主和内寄生生物之间存在基因水平的适应, 即内寄生生物可以调节自己的部分基因来适应宿主对自身的选择, 因此可以用逆向追溯的方法, 通过分析不同宿主某一特定内生生物基因的差异, 重现此内生生物的系统发育史<sup>[8]</sup>.

虫草属真菌是一类宿主特异性比较强的真菌, 通常属于昆虫内生菌, 属于子囊菌门、子囊菌纲、粪壳菌亚纲、肉座菌目、麦角菌科、虫草菌属的一种, 其拉丁学名为 *Cordyceps sinensis* (Berkeley) Saccardo, 无性系包括 *Paecilomyces* sp.<sup>[9-10]</sup>、*Synnematium* sp.<sup>[11]</sup> 等. Nikoh 和 Fukatsu 等通过建立不同宿主的虫草属真菌系统发育树, 阐明了虫草属真菌在开拓新的生态领域过程中, 在不同昆虫以及块菌宿主体内不断进行“宿主跳跃”的现象<sup>[8]</sup>.

目前尚未见从植物内分离到虫草属真菌的报道, 本文报道利用植物内生来源、昆虫和块菌内生来源的虫草属真菌基于 ITS 区序列建立系统发育树, 研究虫草属真菌在其进化历史中是否经历了植物宿主环节的“宿主跳跃”.

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

酿酒葡萄(*Vitis vinifera* L.) 采自黄土高原(北纬 34°, 东经 105°), 番荔枝(*Annona squamosa* L.) 植物根、茎、叶、韧皮部采自福建厦门(北纬 24°, 东经 118°).

收稿日期: 2009-12-22

基金项目: 国家自然科学基金(30570408); 科技部与福建省国际科技合作项目((F)2007DFA30970); 福建省科技攻关课题(2004N002)

\* 通讯作者: xm\_qian@xm.u.edu.cn

表 1 不同宿主来源的虫草属真菌序列信息  
Tab.1 The sequences of *Cordyceps* sp. from different hosts

宿主	种属	来源	DDBJ/ EMBL/ GenBank 数据库序列号
块菌	<i>Cordyceps capitata</i>	日本高松, 香川县	A B027364
块菌	<i>Cordyceps jezoensis</i>	日本宫津, 京都	A B027365
块菌	<i>Cordyceps japonica</i>	日本大阪	A B027366
蝉幼虫	<i>Cordyceps prolifica</i>	日本财田, 德岛	A B027370
蝉幼虫	<i>Cordyceps ramoso-ulvinata</i>	日本鹤冈, 山方	A B027372
蛾蛹	<i>Cordyceps militaris</i>	日本鹤冈, 山方	A B027379
蛾蛹	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	日本宫津, 京都	A B027380
/*	<i>Beauveria bronginartii</i>	日本大阪	A B027381
/*	<i>Beauveria bassiana</i>	日本大阪	A B027382
沫蝉	<i>Cordyceps tricornis</i>	日本财田, 德岛	A B027376
蚱虫	<i>Cordyceps coccidiicola</i>	日本宫津, 京都	A B031196
甲虫幼虫	<i>Cordyceps konnoana</i>	日本室兰, 北海道	A B031193
蝙蝠蛾	<i>Hirsutiella sinensis</i>	中国广东	A J243979
蝙蝠蛾	<i>Hirsutiella sinensis</i>	中国北京	A J243980

/\* . 文献未标明具体宿主, 直接归到蛾分支(moth clade)<sup>[8]</sup>.

其他宿主序列来源根据 Nikoh 和 Fukatsu 等人文章序列登陆号, 见表 1<sup>[8,12]</sup>.

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌丝体的获得、DNA 提取、扩增、测序

菌株在 28 °C 经 PD 液体摇床振摇(120 r/min) 培养 72 h 获得菌丝体, 用改进的 CTAB 法获得 DNA<sup>[13]</sup> 用真菌通用引物 ITS4、ITS5<sup>[14]</sup> 对 ITS 间区序列进行扩增, 扩增程序为 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 20 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min. PCR 产物由上海生工测序.

### 1.2.2 系统发育树的建立

采用 DN Astar 软件对 DNA 序列进行加工, 用 MEGA4.0 软件(集成了 Clustal W) 中的 Neighbor-joining 法对虫草属真菌建立系统发育树, 序列两端截取对齐, bootstrap 重复 1 000 次计算.

## 2 实验结果

从酿酒葡萄和番荔枝的植物组织中共分离得到 586 株植物内生真菌. 其中植物内生真菌 B6 分离自酿酒葡萄根部, A18、C6 分离自番荔枝韧皮部, 经 ITS 测

序鉴定分别为: B6-*Cordyceps sinensis*, A18-*Cordyceps sinensis* (EF488439) 和 C6-*Paecilomyces* sp. (EF488414).

经 MEGA4.0 处理, 得到不同宿主来源的 *Cordyceps* 真菌基于 ITS 间区序列的系统发育树(图 1).

通过图 1 可看出, 菌株 *Beauveria bassiana* AB027382 与菌株 *B. bronginartii* AB027381 以 97% 的支持率形成一个小的分化支, *Paecilomyces tenuipes* AB027380 与 *Cordyceps militaris* AB027379 以 80% 的支持率形成另外一个小的分化支, 同时这两个小分化支以 99% 的高支持率形成一个较大的分化枝, 由于这 4 株菌均是蛾类寄生, 故这一较大的分化支称为“蛾分支”(moth clade); 以此类推, 其他菌株依据发育树中的位置、支持率和宿主来源, 分别形成另外 4 枝——蝉分支(cicada clade)、块菌分支(truffle clade)、甲虫-蚱虫-蝙蝠蛾分支(scale-beetle-hepidae clade)和植物分支(plant clade). 其中, 较引人注目的是两株本实验室分离的植物内生来源的虫草属真菌 *Cordyceps sinensis* A18、*Cordyceps sinensis* B6 以

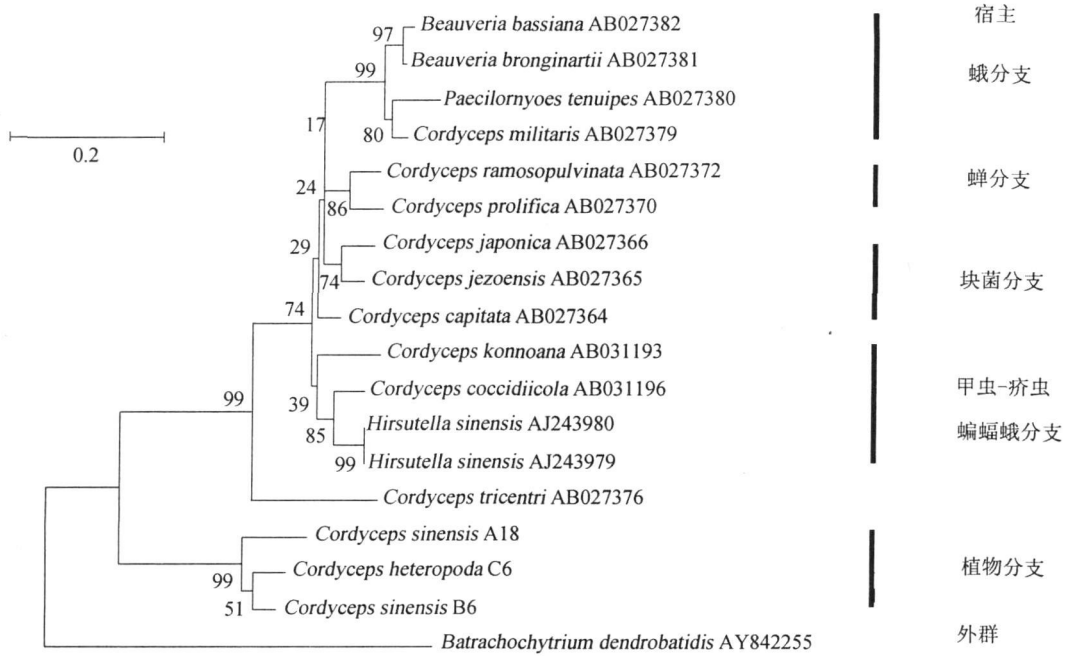


图 1 基于 ITS 序列的虫草属真菌系统发育树(右边为宿主)

Fig. 1 Phylogenetic relationship of *Cordyceps* sp. based on identification of ITS sequences (the hosts were showed in the right side)

及一株拟青霉(*Paecilomyces* sp.) C6 同样以 99% 的高支持率单独形成一支, 即植物分支(plant clade), 而且其亲缘关系距甲虫-疥虫-蝙蝠蛾分枝更近。

### 3 讨论

近年来在植物内生菌多样性研究领域有诸多研究成果发表, 多数为子囊菌<sup>[15]</sup>。虽然肉座菌目中的丛赤壳科为许多植物的优势内生菌, 但仍未见有关从植物组织内分离获得内生的虫草菌。虫草菌因其药用价值常被从土壤中分离。本实验按照植物内生菌分离的方法, 可以确保这 3 个菌株不是表生于植物根部和土壤中的真菌。

Nikoh 和 Fukatsu 等通过比较不同宿主来源的虫草属真菌的细胞核、线粒体内的 SSU rDNA、LSU rDNA, 用不同方法建立系统发育树, 发现虫草属真菌在其发育历史上曾经在不同的昆虫、块菌寄主之间进行过反复的“宿主跳跃”<sup>[8]</sup>。本研究基于 ITS 间区序列, 获得了与 Nikoh、Fukatsu 等一致的实验结果, 都表明来自不同宿主的虫草属真菌各自形成独立类群, 其中 moth clade 和 cicada clade 在发育树上距离较近, 这些虫草属真菌的宿主来源于发育相关的同一群昆虫, 这比较符合“宿主关系假说”的观点; 但与 Nikoh 和 Fukatsu 等的研究结果比较, 本文研究中 cicada clade

和 truffle clade 之间不存在相互交叉的 cicada truffle clade, 未能完全验证虫草属真菌从 cicada clade 向 truffle clade 进行“宿主跳跃”的观点, 这可能是与本研究采用的样本量较小、ITS 间区序列较短(小于 700 bp)所致, 也可能与建树比较过程中比较因素不全等原因有关。但结果表明, ITS 间区较短的序列足以证明植物内生来源的虫草属真菌与虫源和菌源的分离。

植物内生来源的虫草属真菌同样以高支持率单独聚成一枝, 表明植物内生来源的虫草属真菌与昆虫、块菌来源的虫草属真菌相比有较强的独立性, 在虫草属真菌的发育史上极有可能经历了植物宿主这一环节。已有证据清晰地表明虫草属真菌曾经从蝉等宿主“跳跃”迁移到块菌等宿主, 值得注意的是蝉生活史的幼体阶段位于地下, 以植物特别是树根的木质部汁液为生, 而块菌是树木的菌根菌, 整个生活史均在地下的树根部附近, 可能正是由于这种与树木的紧密联系, 促进了虫草属真菌从蝉到块菌的“宿主跳跃”<sup>[8]</sup>。由于蝉、蝉幼体和块菌都与树木紧密相关, 存在频繁的营养交流及紧密的物理接触, 在此过程中虫草属真菌极有可能从蝉幼体或(和)块菌迁移到树中, 完成向植物宿主的“跳跃”, 或先从蝉幼体向植物体再向块菌的迁移, 从而扩大了其生态范围以至完成动物、植物以及菌物多重性协同进化的过程, 这符合“宿主环境假说”的观点。但由于样本量的限制, 本文目前还不能获得虫草属真菌经

植物“宿主跳跃”的全面证据,无法确定植物内生的虫草属真菌与蝉幼体和块菌之间的内在关系,因而本文的意义仅在于报道首次发现植物内生虫草属真菌,以及它们在系统发育中与蝉幼体和块菌来源的虫草属真菌所处的相对独立的分支地位。

### 参考文献:

- [1] Petrini O. Taxonomy of endophytic fungi in aerial plant tissues [C] // Fokkema N J, van den Heuvel J. Microbiology of the Phyllosphere Cambridge. U K: Cambridge University Press, 1991: 175-187.
- [2] Haemmerli U A, Brandle U E, Petrini O. Differentiation of isolate of *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonia errabunda*) from beech, chestnut and oak using RAPD markers [J]. Mol Plant Microbe Interaction, 1992, 5: 479-483.
- [3] Carroll F E, Muller E. Preliminary studies on the incidence of needle endophytes on some European conifers [J]. Sydowia, 1977, 29: 87-103.
- [4] Brooks D R, McLennan D A. Phylogeny, ecology and behaviour: a research program in comparative biology [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1991.
- [5] Shaw S R. Euphorine phylogeny: the evolution of diversity in host utilization by parasitoid wasps (Hymenoptera: Braconidae) [J]. Ecol Entomol, 1988, 13: 323-335.
- [6] Nisbet L J, Fox F M. The importance of microbial diversity to biotechnology [C] // The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its Role in Sustainable Agriculture. Wallingford: CAB International, 1991: 229-244.
- [7] Roth J, Leroith D. The evolutionary origins of intercellular communication and the maginot lines of the mind [J]. Ann New York Academy Sci, 1986, 436: 11.
- [8] Nikoh N, Fukatsu T. Interkingdom host jumping underground: phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps* [J]. Mol Biol Evol, 2000, 17(4): 629-638.
- [9] 陈庆涛, 肖生荣, 施至用. 中国拟青霉新种及其与虫草的关系 [J]. 真菌学报, 1984, 3(1): 24-28.
- [10] 戴如琴, 兰江丽, 陈伟华, 等. 蝙蝠蛾拟青霉新种的研究 [J]. 北京农业大学学报, 1989, 15(2): 221-225.
- [11] 印象初, 沈南英. 冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 的无性世代——中华束丝孢 *Synnematium sinense* Yin et Shen sp. nov. [C] // 高原生物学集刊. 北京: 科学出版社, 1990, 9: 1-5.
- [12] Kinjo Noriko, Zang M u. Morphological and phylogenetic studies on *Cordyceps sinensis* distributed in southwestern China [J]. Mycoscience, 2001, 42: 567-574.
- [13] 张红, 秦莲花, 谭琦, 等. 用改进的 CTAB 法提取香菇基因组 DNA [J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2006, 12(5): 547-550.
- [14] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [C] // Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [15] Carrol G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont [J]. Ecology, 1998, 69: 229.

## A Primary Study of *Cordyceps* sp. About "Host Jumping" Through Plants

LIN Xiao<sup>1,3</sup>, WANG Zeng fu<sup>1</sup>, HUANG Yao jian<sup>1,2</sup>, QIAN Xiao ming<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, 2. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, 3. Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Most species of the genus *Cordyceps* sp. are endoparasitic or endophytic fungi of insects and other arthropods. Up to now it was guessed that the interkingdom host jumping is only possible from Animalia to Fungi. Two endophytic *Cordyceps* sp. and one *Paecilomyces* sp. were isolated from *Vitis vinifera* L. and the pharmaceutical plant *Annona squamosa* L. and then identified. The phylogenetic relationship of *Cordyceps* sp., originating from different hosts, was found based on the ITS sequences from insects, truffles and plants. The result reflects the phenomenon that *Cordyceps* sp. evolves in different hosts. During the process of its evolution *Cordyceps* sp. could be observed "host jumping" among insects, truffles and plants as well.

**Key words:** endophytic fungi; *Cordyceps* sp.; host jumping