



陕西省野生拟黑虫草的多基因分子生物学鉴定

孟桂花, 李孟楼, 王春燕*

(西北农林科技大学 林学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 虫草是中国重要的生物资源, 为明确从陕西省旬邑县石门山林区采集到的 1 种野生虫草种类及其虫生真菌(虫草菌 DY6F)的分类地位, 研究在利用 PCR 技术对该虫草子实体的核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)、延伸因子 1 α (elongation factor 1 α , EF-1 α)和 RNA 聚合酶 II 大亚基(RNA polymerase II large subunit, RPB1)的基因片段进行扩增与测序的基础上, 分别基于这 3 个基因片段构建单基因系统进化树, 并基于 EF-1 α 和 RPB1 2 个基因联合序列构建多基因系统进化树。结果显示, 该虫草子实体的这些基因序列与线虫草属拟黑虫草菌(*Ophiocordyceps nigrella*)的相应基因序列相似度为 99%~100%, 且在进化树上, 二者聚于同一分支, 支持率均为 100%。因此, 虫草菌 DY6F 被鉴定为拟黑虫草菌, 该虫草为拟黑虫草。

关键词: 拟黑虫草; 系统进化树; 单基因; 多基因

中图分类号: S718 文献标志码: A

Identification of Wild *Ophiocordyceps nigrella* Based on Multiple-gene Sequence Analysis in Shaanxi Province

MENG Guihua, LI Menglou, WANG Chunyan*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Cordyceps is an important biological resource in China. In order to clarify the species of a wild cordyceps collected from Shimen Mountain Forest Area in Xunyi County of Shaanxi Province and the taxonomic status of its entomogenous fungus (cordyceps fungus DY6F), authors amplified the gene fragments of internal transcribed spacer (ITS), elongation factor 1 α (EF-1 α) and RNA polymerase II large subunit (RPB1) of cordyceps fungus DY6F by PCR technique and sequenced the products. Subsequently, the phylogenetic trees based on ITS, EF-1 α and RPB1 gene fragment, respectively, as well as a multi-locus phylogenetic tree based on EF-1 α and RPB1 combined nucleotide sequences were constructed. According to the results, the similarity between these three gene sequences of cordyceps fungus DY6F and the corresponding gene sequences of *Ophiocordyceps nigrella* was 99%-100%. In the evolutionary tree, cordyceps fungus DY6F and *Ophiocordyceps nigrella* were clustered into one branch, with an approval rating of 100%. Therefore, the cordyceps fungus DY6F was identified as *O. nigrella*.

Key words: *Ophiocordyceps nigrella*; phylogenetic tree; single gene; multiple gene

虫草是虫生真菌寄生于昆虫虫体后形成的菌虫复合体, 包括寄生真菌和寄主昆虫两部分。长期以

来, 人们习惯将虫生真菌、虫生真菌与其寄主形成的复合体均称为虫草, 而未将二者区分开, 造成了名称

使用上的混乱,易引起非专业人员的混淆。为此,Zhang 等^[1]提出了新的术语规则:在仅指形成虫草的虫生真菌时使用虫草菌、冬虫夏草菌等名称,而涉及到虫生真菌与寄主形成的复合体时使用虫草、冬虫夏草等名称,由此避免名称混淆。虫草菌是广义虫草属(*Cordyceps* s. l.)所有真菌的统称,作为昆虫病原真菌,可被开发成生防菌剂,在害虫生物防治领域发挥着重要作用^[2]。虫草菌隶属于子囊菌门(Ascomycota),是子囊菌中多样性较高的类群之一,全世界已报道的虫草菌有近千种^[3],中国已报道的虫草菌约 120 种^[4]。虫草菌不仅种类繁多,其寄主种类也比较复杂,不同虫草菌侵染的昆虫种类及范围不同,因此仅依靠传统的形态学很难对虫草种类进行准确的分类鉴定。近年来,分子生物学技术在虫草菌物种鉴定及其与相关属真菌之间亲缘关系的认定中发挥了重要作用^[2],极大提升了虫草物种分类鉴定的效率和准确性。

在分子生物学鉴定过程中,由于绝大多数单基因系统进化树在某些关键节点上的支持率较低、聚类可信度不高,因而仅依靠单基因进行物种的分类鉴定存在一定的局限性^[4]。多基因涵盖的信息比单基因多,通过联合多个 DNA 片段构建的多基因系统进化树能更可靠地反映物种之间真正的系统发育关系^[5-6],也能明显提高进化树的分辨率和可信度^[7]。如今,多基因联合分析也被广泛地用于虫草菌分类地位的鉴定中^[8-9]。Sung 等^[10]利用核糖体大亚基 LSU 和小亚基 SSU、RNA 聚合酶 II 大亚基 RPB1 和小亚基 RPB1 及 EF-1 α 等多个基因位点对虫草类真菌进行了系统分类,将广义的虫草属重新分成了 4 个属:狭义虫草属(*Cordyceps* s. s.)、鹿虫草属(*Elaphocordyceps*)、异虫草属(*Metacordyceps*)和线虫草属(*Ophiocordyceps*),该分类系统被学术界广泛认可和接受。

张兴民等^[11]根据虫草子座及虫体形态,将陕西省旬邑县石门山林区采集到的野生虫草初步鉴定为山西省报道过的香棒虫草(*O. barnesii*),但该林区虫草的产量比山西的香棒虫草大,且发现的寄主昆虫仅小阔胫绒金龟(*Maladera ovatula*)1 种,而已报道的香棒虫草的寄主种类比较复杂,因此该虫草是否为香棒虫草需进一步验证。本研究在形态学观察的基础上,通过多基因序列分析和系统进化树的构建,以 Wang 等^[12]建立的多基因系统进化树为佐证,明确石门山林区虫草的种类及其虫草菌的分类地位,以期丰富陕西省的虫草真菌资源,为陕西省虫

草资源的保护和可持续利用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 标本采集

野生虫草标本采集自陕西省旬邑县石门山林区。刮去采集的虫草表面土壤后用报纸包裹放入灭菌的塑封袋中,置于 4 °C 冰箱内保存备用。

1.2 形态观察

测量虫草子实体及虫体的长度和直径,用体视显微镜观察虫草子实体的着生位置、子实体顶部和虫体的形态,拍照并记录相关数据。

1.3 分子生物学鉴定

1.3.1 DNA 提取

在超净工作台内,使用无菌手术剪将虫草子实体和虫体分别剪成长 5 mm 的小段置于培养皿中,依次用升汞水溶液浸泡 30 s,75%酒精浸泡 3 min,无菌水清洗 4~5 次。用无菌滤纸吸干样品表面的水后将其放入无菌研钵中,加入液氮研磨成粉末。最后,用 CTAB 法^[13]提取 DNA 作为后续基因扩增的模板。

1.3.2 目的基因扩增及测序

使用 3 对引物(ITS1 和 ITS4^[14]、983F 和 2218R^[15]、CRPB1 和 RPB1Cr^[16]),由上海生物技术公司合成)对虫草菌 DY6F 的 3 个 DNA 序列位点(ITS、EF-1 α 和 RPB1)分别进行扩增,扩增体系参照仇飞^[17]的方法。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后于紫外透射下观察 PCR 条带,检测合格后送至陕西杨凌天润奥科生物公司进行双端测序。

1.3.3 序列比对和系统进化树的构建

将测序所得的基因序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,并从 GenBank 中分别下载同源性较高的 ITS、EF-1 α 和 RPB1 基因序列,用 ClustalW 进行基因序列的比对,序列两端截齐后使用 Mega7.0 构建单基因 Neighbor-Joining(NJ)系统进化树,进化树各分支上的数值为经 1 000 次 Bootstrap 后的置信度。利用 PhyloSuite v1.2.2(<http://phylosuite.jushengwu.com/>)软件将 EF-1 α 和 RPB1 的基因序列串联成数据集,通过 ModelFinder 计算这 2 个基因序列的最佳模型,并用 Mr-Bayes 的贝叶斯推理法(Bayesian Intreence, BI)构建多基因系统进化树,通过节点上的后验概率值(Bayesian posterior probability, BP)评估构建的进化树,最后用 Chiplot 网站(<https://www.chiplot.online/tvbot.html>)进行系统进化树的美化^[18]。

2 结果与分析

2.1 形态观察

虫草子实体从寄主昆虫幼虫头部的下侧方长出,无分支,棍棒状(图 1,A),顶部呈圆形或钝头状(图 1,B),长度为 3~6.2 cm,直径为 0.1~0.2 cm;新鲜时为黄褐色,晒干后呈棕褐色,品相较差。寄主为金龟子幼虫(又称蛴螬),虫体粗而肥,黄色,呈直线型或 C 型弯曲,长度为 1.2~1.9 cm,直径 0.2~0.6 cm(图 1,C)。



A. 虫草子实体形态;B. 虫草子实体顶部;C. 寄主。

图 1 虫草标本的形态特征

A. Morphological characteristics of fruiting body;
B. Top of fruiting body; C. Host.

Fig. 1 Morphological characteristics of cordyceps

2.2 序列比对及系统进化分析

2.2.1 基因测序结果与序列比对

研究获得虫草菌 DY6F 的 ITS、EF-1 α 和 RPB1 基因片段的长度分别为 576,921,732 bp,将所得序列提交至 GenBank,获取登录号分别为 OQ711778、OQ828437、OQ828436。NCBI 在线 Blast 比对的结果显示,这 3 个基因的序列与拟黑虫草菌(*O. nigrell*-*la*)相应基因序列的相似度最高(99%~100%),而与线虫草属(*Ophiocordyceps*)其他种相应基因序列的相似度只在 80%~90%之间。由此可见,虫草菌 DY6F 与拟黑虫草菌的亲缘关系最近。

2.2.2 单基因系统进化分析

基于所获得的虫草菌 DY6F 的 3 个基因片段的序列,以及下载的相似度较高的其他物种的基因序列,分别构建了 ITS(图 2)、EF-1 α (图 3)和 RPB1(图 4)单基因 NJ 系统进化树。这 3 个进化树的拓扑结构基本一致,虫草菌 DY6F 与拟黑虫草菌聚居于同一个分支,支持率达到 100%,表明虫草菌 DY6F 与拟黑虫草菌的遗传距离最近。但基于 ITS 和 RPB1 基因序列构建的单基因 NJ 系统进化树中,不同种的很多上级分支节点的支持率都低于 60%,聚类可信度相对较低。

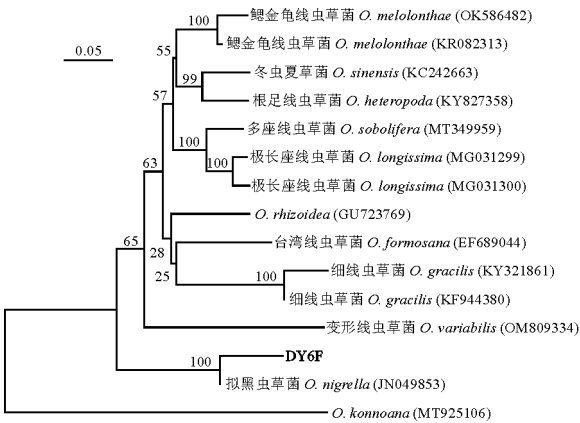


图 2 基于 ITS 序列构建的 NJ 系统进化树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree based on ITS sequences

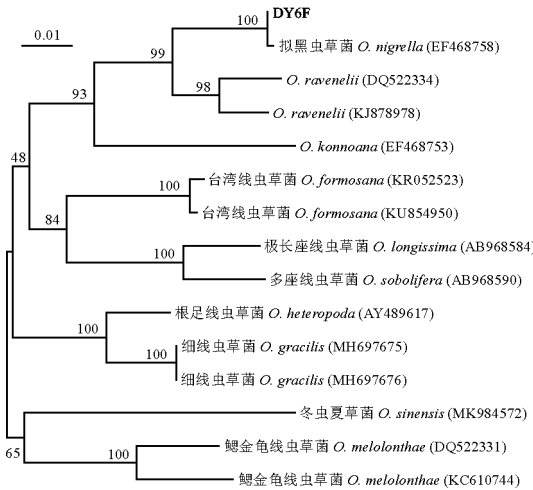


图 3 基于 EF-1 α 序列构建的 NJ 系统进化树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on EF-1 α sequences

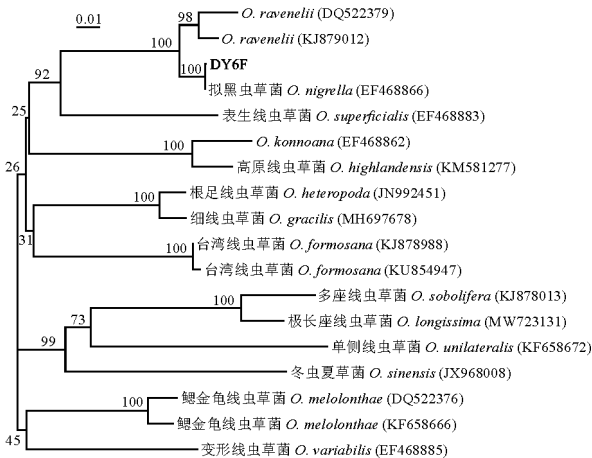


图 4 基于 RPB1 序列构建的 NJ 系统进化树

Fig. 4 NJ phylogenetic tree based on RPB1 sequences

2.2.3 多基因联合系统进化分析

通过 ModelFinder 计算出的 EF-1 α 和 RPB1 基因数据分区的最佳模型为 GTR+G+I,它们的串联序列数据集由 1 641 个碱基组成,其中 GC 含量为

56.7%,AT 含量为 43.3%。所构建的多基因系统进化树各分支的支持率较高,除 3 个分支节点外,支持率均超过 95%;不同种上级分支节点的支持率也比单基因系统进化树中同一节点的支持率高,线虫草属内同种不同菌株均能聚集于同一分支,且支持率均为 100%(图 5)。这表明,所构建的多基因系统进化树的聚类结果较为可信。

多基因系统进化树大致可分为 3 个不同的系统进化支,分别为 *Hirsutella* 进化支、*O. sobolifera*

进化支和 *O. ravenelii* 进化支;在 *O. ravenelii* 进化支的亚分支 *ravenelii-scarabaeidae* 中,*O. highlandensis*、*O. konnoana* 和 *O. barnesii* 形成 1 个姐妹群,*O. ravenelii*、*O. superficialis* 和拟黑虫草菌形成 1 个姐妹群,而虫草菌 DY6F 与拟黑虫草菌聚于同一分支,支持率为 100%(图 5)。综上所述,虫草菌 DY6F 被鉴定为拟黑虫草菌,石门山林区发现的野生虫草为拟黑虫草,这是陕西省境内发现的又一种新的虫草资源。

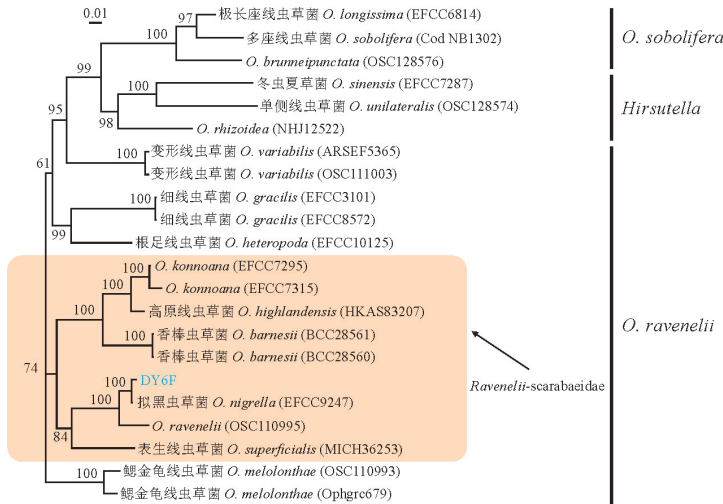


图 5 基于 EF-1α 和 RPB1 序列联合矩阵构建的 BI 系统进化树

Fig. 5 BI phylogenetic tree inferred from combined EF-1α and RPB1 sequences

3 讨 论

多基因联合分析能突破单基因分析的局限,可以更准确地反映菌株间的亲缘关系及分类地位。本研究基于虫草菌 DY6F 的 ITS、EF-1α 和 RPB1 基因序列分别构建了单基因及多基因联合系统进化树,最终将陕西省旬邑县石门山林区的虫草菌 DY6F 鉴定为拟黑虫草菌,野生虫草鉴定为拟黑虫草。拟黑虫草是拟黑虫草菌寄生于金龟子幼虫后形成的菌虫复合体,拟黑虫草菌是广义虫草属的一种,隶属于囊菌门(Ascomycota)、粪壳菌纲(Sordariomycetes)、肉座菌目(Hypocreales)、线虫草科(Ophiocordycipitaceae)、线虫草属(*Ophiocordyceps*)^[10]。国内外关于拟黑虫草的研究相对较少,日本曾报道过拟黑虫草的生长环境和宏观形态特征^[19],国内有学者对山西境内采集到的拟黑虫草的遗传多样性及其区系真菌多样性进行了研究^[20-21]。本研究首次在陕西省发现了拟黑虫草,增加了拟黑虫草在中国的分布地区,为拟黑虫草这一珍稀虫草资源的利用提供了基础。

陕西省境内发现的植物新类群较多^[22-24],而关

于虫草的报道相对较少,目前已发现的虫草种类有变形虫草(*O. variabilis*)、布氏虫草(*C. brongniartii*)^[25]及秦巴蛹虫草(*C. militaris*)^[26]等,主要分布于秦岭地区。本研究鉴定所得的拟黑虫草是陕西省新发现的一种虫草资源。张兴民等^[11]调查发现,旬邑县药商从 2016 年起就开始大量收购拟黑虫草(曾被鉴定为香棒虫草),每 1 kg 价格在 600 元以上,表明拟黑虫草具有很高的药用价值和市场前景。但目前关于拟黑虫草生物学及化学药理成分的研究很少,无法明确其质量、药用功能及作用,阻碍了拟黑虫草的开发利用。野生冬虫夏草资源极度缺乏,国内外学者长期致力于冬虫夏草的人工培养及其替代品的研究。培育近缘种作为冬虫夏草替代品具有最大的优势^[27-28],拟黑虫草与冬虫夏草同科同属,亲缘关系较近,具有冬虫夏草替代品的潜能,本研究未分离培养出拟黑虫草无性型。因此,后续需加强拟黑虫草的生物学特性及人工培育技术研究,深入考察拟黑虫草的药效,揭示其药用价值,明确其被开发成冬虫夏草替代品进行产业化生产的可行性和市场前景,并建立科学合理的保护和可持续利用机制。

参考文献:

[1] ZHANG Y J, LI E W, WANG C S, *et al.* *Ophiocordyceps sinensis*, the flagship fungus of China: Terminology, life strategy and ecology[J]. *Mycology*, 2012, **3**(1): 2-10.

[2] 李增智, HYWEL-JONENIGEL L, 孙长胜. 虫草文化及科学史[J]. 菌物学报, 2022, **41**(11): 1 731-1 760.

LI Z Z, HYWEL-JONENIGEL L, SUN C S. History of *Cordyceps* culture and science[J]. *Mycosystema*, 2022, **41**(11): 1 731-1 760.

[3] 李 熠, 宋 斌, 王 科, 等. 中国广义虫草受威胁物种现状及保护[J]. 食用菌学报, 2021, **28**(2): 113-122.

LI Y, SONG B, WANG K, *et al.* Current status and protection of threatened *Cordyceps* s. l. species in China[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2021, **28**(2): 113-122.

[4] 梁宗琦. 中国真菌志:第三十二卷(虫草属)[M]. 北京: 科学出版社, 2007.

[5] MORIWAKI J, TSUKIBOSHI T, SATO T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2002, **68**(4): 307-320.

[6] 于帮红, 徐 慧, 张传博. 一株冬虫夏草来源真菌的鉴定及抑菌活性检测[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, **22**(8): 36-40.

YU B H, XU H, ZHANG C B. Identification of fungi from *Cordyceps sinensis* and its antibacterial activity[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2016, **22**(8): 36-40.

[7] DEVULDER G, DE MONTCLOS M P, FLANDROIS J P. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, **55**(Pt 1): 293-302.

[8] CHEN Z H, DAI Y D, YU H, *et al.* Systematic analyses of *Ophiocordyceps lanpingensis* sp. nov., a new species of *Ophiocordyceps* in China [J]. *Microbiological Research*, 2013, **168**(8): 525-532.

[9] TASANATHAI K, NOISRIPOOM W, CHAITIKA T, *et al.* Phylogenetic and morphological classification of *Ophiocordyceps* species on termites from Thailand[J]. *MycKeys*, 2019, **56**: 101-129.

[10] SUNG G H, HYWEL-JONES N L, SUNG J M, *et al.* Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi[J]. *Studies in Mycology*, 2007, **57**: 5-59.

[11] 张兴民, 王 晓, 王春燕, 等. 旬邑县石门山林区特有珍稀虫草资源初考[J]. 陕西林业科技, 2022, **50**(5): 29-31.

ZHANG X M, WANG X, WANG C Y, *et al.* Preliminary study on the rare resources of *Cordyceps* in Shimen Mountain Forest Area of Xunyi County[J]. *Shaanxi Forest Science and Technology*, 2022, **50**(5): 29-31.

[12] WANG Y B, NGUYEN T T, DAI Y D, *et al.* Molecular phylogeny and morphology of *Ophiocordyceps unituberculata* sp. nov. (Ophiocordycipitaceae), a pathogen of caterpillars (Noctuidae, Lepidoptera) from Yunnan, China[J]. *Mycological Progress*, 2018, **17**: 745-753.

[13] LIU Z Y, LIANG Z Q, WHALLEY A J S, *et al.* *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2001, **78**(3): 178-182.

[14] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//

PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.

[15] REHNER S A, BUCKLEY E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs* [J]. *Mycologia*, 2005, **97**(1): 84-98.

[16] CASTLEBURY L A, ROSSMAN A Y, SUNG G H, *et al.* Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus[J]. *Mycological Research*, 2004, **108**(8): 864-872.

[17] 仇 飞. 几种虫草类真菌多基因分子系统学研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.

[18] 黄 姗, 宋章永. 一株引起田间昆虫流行病的虫生真菌的多基因序列鉴定[J]. 植物保护, 2021, **47**(5): 41-51.

HUANG S, SONG Z Y. Identification of pathogenic fungus causing field pests epidemics based on multiple-gene sequence analysis[J]. *Plant Protection*, 2021, **47**(5): 41-51.

[19] 清水大典. 冬虫夏草菌图谱[M]. 东京: 保育社, 1997.

[20] 贺瑞红. 拟黑虫草形态学、遗传分化及区系真菌多样性研究[D]. 太原: 山西大学, 2019.

[21] 郝爱静. 拟黑虫草群落中可培养真菌的多样性研究[D]. 太原: 山西大学, 2018.

[22] 缪 涛, 黎 斌, 寻路路, 等. 陕西省种子植物区系新资料(II)[J]. 西北植物学报, 2023, **43**(3): 523-526.

MIAO T, LI B, XUN L L, *et al.* Some newly recorded spermatophyte to Shaanxi Province, China (II)[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, **43**(3): 523-526.

[23] 寻路路, 李思锋, 李为民, 等. 陕西省十字花科植物新记录[J]. 西北植物学报, 2020, **40**(8): 1 428-1 435.

XUN L L, LI S F, LI W M, *et al.* Newly recorded plants of Brassicaceae from Shaanxi Province[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(8): 1 428-1 435.

[24] 郑 玉, 唐剑泉, 罗梓涵, 等. 秦岭地区蕨类植物新记录属: 荚囊蕨属[J]. 西北植物学报, 2021, **41**(5): 892-893.

ZHENG Y, TANG J Q, LUO Z H, *et al.* *Struthiopteris*: A new record genus of Pteridophytes in Qinling Mountains[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(5): 892-893.

[25] 梁宗琦, 刘爱英, 樊美珍, 等. 西北地区的几种虫草[J]. 真菌学报, 1995, **14**(3): 237-240.

LIANG Z Q, LIU A Y, FAN M Z, *et al.* Several species of *Cordyceps* in northwest area[J]. *Mycosystema*, 1995, **14**(3): 237-240.

[26] 马跃腾, 杜双田, 丁 建, 等. 秦巴蝇虫草原生质体的制备及再生条件研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, **43**(9): 196-202, 209.

MA Y T, DU S T, DING J, *et al.* Study on isolation and regeneration of Qinba *Cordyceps militaris* protoplast [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2015, **43**(9): 196-202, 209.

[27] BARAL B, MAHARJAN J. *In-vitro* culture of *Ophiocordyceps sinensis* (Yarsagumba) and their associated endophytic fungi of Nepal Himalaya[J]. *Scientific World*, 2012, **10**(10): 38-42.

[28] DONG C H, YAO Y J. On the reliability of fungal materials used in studies on *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, **38**(8): 1 027-1 035.

(编辑: 韦青侠)