

冬虫夏草发生发育研究中存在的问题研究

税晓容^{1,2}, 陈 灿^{1,3}, 丁元林⁴, 雷 桅^{1,3}

(1. 广东医学院 生物医药与健康研究所, 广东 湛江 524001; 2. 广东医学院 血管外科研究室, 广东 湛江 524001;
3. 广东医学院 心血管疾病研究室, 广东 湛江 524001; 4. 广东医学院 医学系统生物学研究所, 广东 东莞 523808)

摘 要:冬虫夏草是产自青藏高原的特色名贵药材, 生长于高寒缺氧的极端环境, 具有十分重要的经济价值和研究价值。长期以来, 有关冬虫夏草的研究一直是学术界的热点, 但其发生机理至今未明, 也无法实现其人工培植, 由于独特的发育特性限制了冬虫夏草产业的持续进展。现结合课题组的长期工作基础, 就冬虫夏草发生发育研究中所存在的问题及相关现状进行综述, 以期为一珍贵自然资源的保护和利用提供理论基础。

关键词:冬虫夏草; 青藏高原; 钩蝠蛾; 植物; 发育

中图分类号:S 567.3⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)10-0184-04

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc)是特产于青藏高原的名贵中药材, 具有重要的药用和经济价值, 且至今仍未实现人工培植, 完全依赖于自然生产, 导致资源十分稀少, 其市场价格也屡创新高, 顶级冬虫夏草的价格甚至超过 20 万元·kg⁻¹, 成为青藏高原农牧民重要的经济来源之一, 也是我国最著名的天然药食用真菌。因此, 对冬虫夏草发生发育的生物学研究一直是当今医药领域的研究热点, 但同时由于高原地区各种因素, 限制了人们对冬虫夏草的深入认识。

1 冬虫夏草资源的日益缩减

青藏高原中、东部地区高寒牧区是冬虫夏草的核心分布区, 该区域自然条件极端恶劣, 自然灾害频繁, 农牧民生产生活条件十分艰苦, 收入水平低, 是集中连片的

贫困地区, 贫困面广、贫困程度深、返贫率高。采挖冬虫夏草是该地区农牧民收入的主要来源之一, 所创造的年产值在许多县都超过了 1 000 万元, 如西藏自治区丁青县的冬虫夏草年产值超过 5 500 万元, 收入占该县国内生产总值的 60%以上。近 10 年来, 全球气候变暖、掠夺式采挖及其它各种因子的综合影响, 已严重破坏高寒牧区冬虫夏草适生地的植被和钩蝠蛾属昆虫的生存环境, 导致高寒草甸荒漠化加剧、冬虫夏草及其寄生昆虫的适生地范围萎缩、冬虫夏草资源蕴藏量急剧下降。

随着全球气候变暖, 雪线上升, 冬虫夏草分布区的海拔下限上移、面积缩小。冬虫夏草的分布区已从原来的 2 800~5 000 m 的高寒草甸和灌丛等上移到海拔 4 200~5 200 m 的高寒草甸、灌丛和稀疏植物混合冰碛物及砂砾石等区域, 核心分布区则从海拔 4 000~4 500 m 缩小至海拔 4 600~4 800 m 的区域内^[1]。青海玉树冬虫夏草海拔分布下限在 1960 年(3 500 m)和 1990 年(4 500 m)的差异也说明了这个问题^[2-3]。当然, 冬虫夏草分布海拔的升高主要取决于环境因子的影响, 如温度、土壤湿度和植被变化等。

2 冬虫夏草生物学研究的困难

2.1 冬虫夏草的发生机理

冬虫夏草的生活史包括有性阶段和无性阶段。其

第一作者简介:税晓容(1985-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:shuixiaor@126.com.

责任作者:雷桅(1982-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事冬虫夏草发育生物学与药理活性评价等研究工作。E-mail:leiwei2006@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81300035, 81403044); 广东省公益研究与能力建设专项资助项目(2015A020210097); 广东省自然科学基金资助项目(2015A030313520)。

收稿日期:2016-02-15

Abstract: With the characters of thin-shinned, succulence, and soft flesh leech on to limb, 'Red Globe' grape usually happened deterioration and browning as well as rotten. So storage methods should be taken to restraint the decrepitude. This paper summarized the fresh-keeping methods including physical, chemical and biological methods, introduced every technology theory and its limitations, and at last research emphasis was pointed out, which might provide subservient references for the development of Chinese grape industry in the future.

Keywords: 'Red Globe' grape; preservation; prospection

中,有性阶段是有性繁殖形态,包括子座、子囊、子囊孢子等部分;无性阶段是营养生长和无性繁殖形态,无性型被认为是中国被毛孢 *Hirsutella sinensis*^[3-4],有菌丝、分生孢子或者其它某些未知结构。目前,仅知道中国被毛孢侵染并寄生于钩蛾幼虫,在某种条件下内生菌群使寄主幼虫致病,幼虫经过罹病、死亡、僵化后,直至长出子座。然而迄今为止,仍存在着太多的疑惑和难题,例如:中国被毛孢是以何种形式经何种途径侵染钩蛾幼虫?其无性型又是如何转变为有性型的?这个过程在何时何种条件下发生?以及有哪些因素影响着这些过程?而且正是这些悬而未决的难题制约着冬虫夏草这一珍贵药用资源的可持续发展。关于冬虫夏草的发生机理,虽然目前已存在多种理论、推论、假说或假设,众说纷纭,莫衷一是,也有很多研究机构在为之努力探索,但均缺乏有力的证据和确切的结论。

2.2 中国被毛孢的侵染途径

虫生真菌侵染昆虫的途径通常有 2 种,其中少量的通过口腔进入寄主,而余下大多数则是通过昆虫表皮侵入体内。口腔侵染研究较少,一般认为病原微生物主要从中肠侵入血腔。表皮侵染机制存在于大量真菌中,特别是生物防治领域,诸如研究较深入的白僵菌、绿僵菌等,其过程可分为 10 个阶段:分生孢子附着、分生孢子落在昆虫表皮上萌发、穿透表皮、菌丝在血腔内生长、毒素的产生、寄主死亡、菌丝侵入寄主的所有器官、菌丝穿出表皮、产生侵染单位、侵染单位扩散^[5]。然而,由于种种原因,对中国被毛孢的侵染机理至今仍几乎一无所知,因此有人推测该菌应该与其它虫生真菌类似,是通过表皮侵染进入钩蛾幼虫^[6],而也有文献推论中国被毛孢可能经口腔进食途径侵入寄主^[7],但迄今仍无确切证据支持哪种途径才是中国被毛孢的侵染方式。

中山大学冬虫夏草研究团队检测了藏北纳木错湖区、藏南色季拉山 4 个海拔梯度、冬季和夏季等不同地区和时间冬虫夏草适生地内钩蛾幼虫体内中国被毛孢的定殖动态,发现表皮、脂肪体和肠壁的带菌量均随海拔升高而增加,血淋巴反之^[8-9]。然后建立该菌基于表皮、脂肪体、血淋巴、肠壁和肠道内含物等组织的海拔垂直流行学模型。最后,分别构建了表皮侵染途径(R^2 0.678)和口腔侵染途径(R^2 0.271)2 种 Holt 模型,经过比较分析后,支持了口腔摄食侵染理论的可行性,表明中国被毛孢可以通过菌根植物实现其对钩蛾幼虫带菌生长、侵染和寄生,有利于有性阶段的发生与种群的复壮和进化,从而进一步论证了菌根植物在冬虫夏草发生过程中的作用^[10]。

2.3 中国被毛孢的寄生状态及寄生生物量的检测

冬虫夏草是一种虫生真菌,与已被深入研究的金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)和球孢白僵菌

(*Beauveria bassiana*)等类似,也被认为具有典型的双型现象。前人曾报道中国被毛孢侵染钩蛾幼虫体腔后,罹病幼虫在某个阶段时其血淋巴中可见长椭圆形或长梭形的虫菌体形态,以顶端出芽方式增殖,分隔分化,互相质配^[11-12]。然而,这些“冬虫夏草菌体”都是非特异性鉴定,即只是显微观察到血淋巴中的虫菌体细胞形态,但这种菌体是否确实冬虫夏草无性型,并未可知,而且就钩蛾幼虫所携带的复杂真菌群落来看,其血淋巴中定殖着多种菌群,甚至很可能包括增殖力更强的拟青霉属真菌等。因此,必须开发冬虫夏草特异性手段才能准确地检视冬虫夏草无性型在钩蛾幼虫体内的寄生形态,并跟踪监视其动态变化过程。

除了寄生形态外,另一个值得关注的关键问题是中国被毛孢的寄生生物量。中国被毛孢对寄主钩蛾幼虫的带菌生长、侵染、寄生和致病这些重要环节都依赖于该菌的定殖和增殖,所以要解析冬虫夏草发生的过程必须要量化中国被毛孢种群在寄主和微生态环境中的变化。由于冬虫夏草无性型中国被毛孢形态不定,生长速度极其缓慢,培养条件又非常苛刻,而且至今仍无法从钩蛾幼虫、植物和土壤等环境中直接分离获得,因此无法像其它病原菌那样通过分离和纯培养来进行定量分析,那么基于现代分子生物学手段,建立和开发中国被毛孢实时定量检测技术将非常必要。

基于 real-time qPCR 方法,设计中国被毛孢物种特异性引物 IF2 和 IR2,建立了高灵敏度和高特异性的中国被毛孢实时定量检测技术体系($R^2=0.999\ 419$),并应用于测定其在寄主钩蛾幼虫表皮、脂肪体、血淋巴、肠壁、肠道内含物和建群种宿主植物根茎叶组织中的定殖丰度^[8]。同时,结合 FISH 技术的特异性形态观察和采用植物提取物培养菌丝体的菌落比较,发现根系能为中国被毛孢的生长提供必要的营养物质和良好的栖息场所,并且该菌主要以菌丝的发育形式存在,而在感染早期的幼虫血淋巴中存在虫菌体单细胞形态的发育阶段^[9]。

2.4 中国被毛孢与植物的“潜在”关系

在自然界中,真菌与植物存在多样而复杂的关系,比如根际定殖、致病、内生和共生等。致病真菌会摄取植物营养,侵害植物体,并产生明显的病理作用和病症反应,如白粉菌、霜霉菌等。内生真菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部的真菌^[13-14]。近年来,已从黄瓜根和水稻叶子等植物器官内分离到大量内生真菌,共计在 80 多个属的几百种禾本科植物中发现有内生真菌^[15-16]。内生真菌系统地分布于植物体根、茎、叶、花、果实和种子等器官、组织的细胞或细胞间隙。不同的内生真菌占据不同的生态位,它们相互作用,建立一种共生平衡,并与宿

主植物长期协同进化,彼此构成稳定的生态关系。一方面植物为其内生菌提供生长所必需的能量和营养;另一方面内生菌又对植物产生有益的影响,包括促进植物生长、变更植物群落结构、增强宿主抗逆境和抗病虫害的能力等^[17]。

菌根真菌也是内生真菌中的一类,它是与植物的根系形成一种互惠共生关系,地球上 97% 的植物都能形成菌根,它对植物生长发育的有益作用已经得到广泛认可^[18]。作为土壤中的重要生物成员之一,菌根真菌具有丰富的遗传多样性、物种多样性和功能多样性,其对植物的关系主要表现为影响陆生植物起源、进化、演化与分布;促进植物的生长发育;提高植物的抗逆性^[19]。

对于虫生真菌而言,植物除了在其侵染过程中发挥作用外,也可能与菌种的传播、延续和扩散相关^[20]。IGNOFFO 等^[21]用莱氏野村菌菌液浸泡大豆种子,待萌发后将幼苗叶子饲喂粉纹夜蛾,并导致幼虫感染致病,说明病原菌可以随植物生长发育而蔓延至全株。此外,某些虫生真菌在侵染昆虫的同时,也能作为内生真菌长期定殖于植物组织中,且不会对植物体造成明显病害,诸如白僵菌 *Beauveria* sp.、拟青霉 *Paecilomyces* sp. 和曲霉 *Aspergillus* sp. 等^[21-26]。

冬虫夏草发生过程的 2 个基本元件:中国被毛孢和钩蝠蛾昆虫,其中钩蝠蛾昆虫已经被证实是植食性昆

虫,以高寒草本和灌木的嫩根为食^[27]。而在前期已报道检测了植物根系中中国被毛孢的定殖情况,基本确定和阐明了该菌与植物之间的基本关系。然而,要深入明确中国被毛孢与高寒植物协同进化的机制,以及这种关系对冬虫夏草发生过程的作用还有待进一步研究。

2.5 生态因子对冬虫夏草发育的影响

中国被毛孢与宿主植物及寄主昆虫的依存关系与冬虫夏草的发育过程息息相关,密不可分。然而,冬虫夏草适生地分布于青藏高原的高寒地带,该地区海拔高、环境恶劣、人迹罕至,这些客观因素给冬虫夏草的系统研究带来巨大的困难和挑战,限制了研究工作的深入开展。自 1958 年我国开始冬虫夏草研究以来,虽有许多文献报道,但一直缺乏系统的前瞻性研究。

特别是对各种冬虫夏草发生影响因子的研究,主要局限于当地环境和气象信息的初步描述,尚无生态因子单独或协同影响冬虫夏草发生效应的深入评价研究。各种环境因子影响冬虫夏草发育过程的机制是冬虫夏草资源可持续利用研究中亟待解决的课题之一,只有明确了关键影响因子对冬虫夏草及其寄主昆虫产生的可能影响,才能有的放矢地制定应对策略。

中国被毛孢、宿主植物和寄主钩蝠蛾昆虫是冬虫夏草形成 3 个主体元素,三者相互作用、相互依存,并在伴生菌及环境因子等影响下实现冬虫夏草的发生过程(图 1)^[28]。

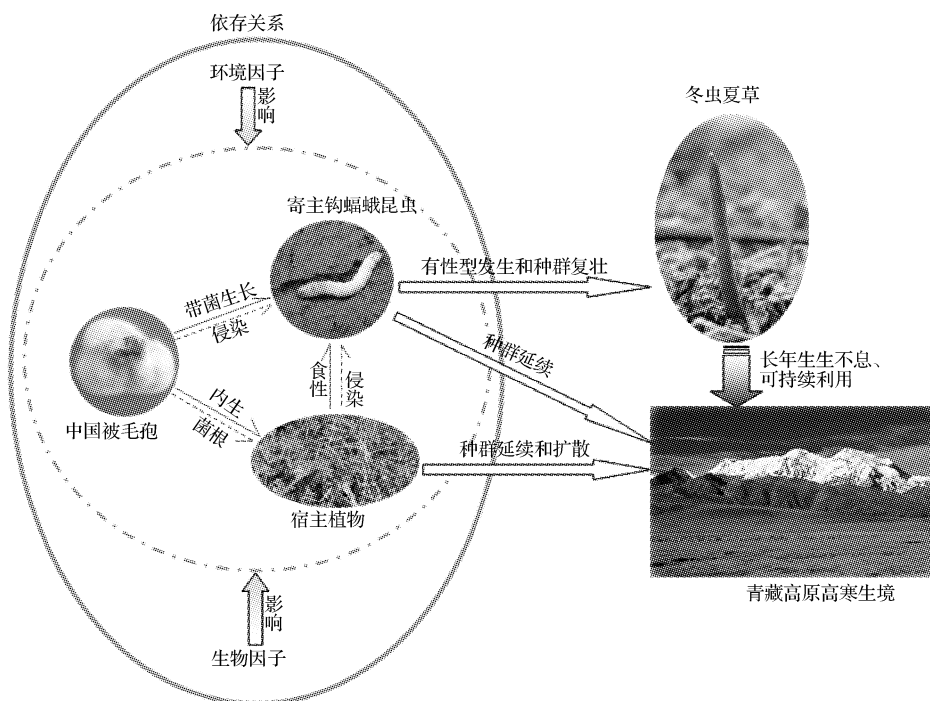


图 1 冬虫夏草的发生及其对生态环境的响应过程

3 结论与讨论

作为世界上极具价值的真菌之一,有关其生物学特

性和可持续发展关键技术的研究一直是科学界努力攻关的热点。目前冬虫夏草的发生机理尚不清楚,也缺乏对生态因子影响其生长过程的系统评价,从而极大地制

约了这一珍稀自然资源的开发利用。开展中国被毛孢、宿主植物及寄主昆虫三者之间依存关系的系统研究,对冬虫夏草发生机理的揭示,及其资源的有效保护和可持续利用都具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] 杨大荣. 青藏高原冬虫夏草考察纪行[J]. 大自然, 2008(1): 36-39.
- [2] 刁治民. 青海冬虫夏草资源及生物学特性的初步研究[J]. 生物学杂志, 1996(2): 20-22.
- [3] 刘兆红, 刘玉玲. 玉树州冬虫夏草资源与分布[J]. 草业与畜牧, 2006(12): 34-36.
- [4] 刘锡进, 郭英兰, 俞永信, 等. 冬虫夏草菌无性阶段的分离和鉴定[J]. 真菌学报, 1989, 5(1): 35-45.
- [5] CHEN Y Q, WANG N, ZHOU H, et al. Differentiation of medicinal *Cordyceps species* by rDNA ITS sequence analysis[J]. *Planta Med*, 2002, 68(7): 635-639.
- [6] 蒲蜚龙, 李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996.
- [7] 陆龙喜, 刘淑梅, 时连根. 冬虫夏草研究的新进展[J]. 生物学通报, 2002, 37(6): 4-6.
- [8] ZHANG Y J, LIU X Z, WANG M. Cloning, expression, and characterization of two novel cuticle-degrading serine proteases from the entomopathogenic fungus *Cordyceps sinensis*[J]. *Res Microbiol*, 2008, 159(6): 462-469.
- [9] LEI W, LI S S, ZHANG G R, et al. A real-time qPCR assay to quantify *Ophiocordyceps sinensis* biomass in *Thitarodes* larvae[J]. *J Microbiol*, 2013, 51(2): 229-233.
- [10] 雷桅, 张古忍, 刘昕. 钩蝇蛾幼虫寄生冬虫夏草菌潜伏侵染过程的研究[J]. 环境昆虫学报, 2015, 37(2): 78-82.
- [11] LEI W, ZHANG G R, PENG Q Y, et al. Development of *Ophiocordyceps sinensis* through plant-mediated interkingdom host colonization[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 17482-17493.
- [12] 曾伟, 尹定华, 李泉森, 等. 冬虫夏草菌侵染及寄生阶段的生长发育研究[J]. 菌物学报, 2006, 25(4): 646-650.
- [13] 齐丽丽. 蒲氏蝇蛾不同发育阶段被中国被毛孢寄生的动态研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.
- [14] SIGEL M R, LATCH G C M, JOHNSON M C. Fungal endophytes of grasses[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2003, 25(4): 293-315.
- [15] CARROLL G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont[J]. *Ecology*, 1988, 69(1): 2-9.
- [16] MCLNORY J A, KOEPPER J W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweetcom[J]. *Plant Soil*, 1995, 173(2): 337-342.
- [17] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91.
- [18] 梁宇, 高玉葆. 内生真菌对植物生长发育及抗逆性的影响[J]. 植物学通报, 2000, 17(1): 52-59.
- [19] 张春英. 植物的亲密伙伴: 菌根[J]. 林业与生态, 2012(2): 38.
- [20] 徐丽娟, 刁志凯, 李岩, 等. 菌根真菌的生理生态功能[J]. 应用生态学报, 2012, 23(1): 285-292.
- [21] IGNOFFO C M, GARCIA C, HOSTETTER D L, et al. Laboratory studies of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*: Soil-borne contamination of soybean seedlings and dispersal of diseased larvae of *Trichoplusia ni*[J]. *J Invertebr Pathol*, 1977, 29(2): 147-152.
- [22] WAGNER B, LEWIS L. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. *Appl Environ Microb*, 2000, 66(8): 3468-3473.
- [23] ARNOLD A E, LEWIS L C. Ecology and evolution of fungal endophytes and their roles against insects. In: VEGA F and BLACKWELL M eds. Ecological and evolutionary advances in insect-fungus associations[M]. Oxford: Oxford University Press, 2005.
- [24] QUESADA-MORAGA E, LANDA B B, MUÑOZ-LEDESMA J, et al. Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain[J]. *Mycopathologia*, 2006, 161(5): 323-329.
- [25] AKELLO J, DUBOIS T, GOLD C S, et al. *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.)[J]. *J Invertebr Pathol*, 2007, 96(1): 34-42.
- [26] POSADA F, AIME M C, PETERSON S W, et al. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales)[J]. *Mycol Res*, 2007, 111(Pt 6): 748-757.
- [27] LEI W, CHEN H, ZHANG G R, et al. Molecular identification and food source inference of constructive plants, native to the *Ophiocordyceps sinensis* Habitat[J]. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10(2): 159-167.
- [28] 雷桅. 高寒生境中国被毛孢与宿主植物及寄主昆虫依存关系研究[D]. 广州: 中山大学, 2012.

Study on Problems in the Field of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc Occurrence and Development

SHUI Xiaorong^{1,2}, CHEN Can^{1,3}, DING Yuanlin⁴, LEI Wei^{1,3}

(1. Institute of Biomedicine and Health, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001; 2. Laboratory of Vascular Surgery, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001; 3. Laboratory of Cardiovascular Diseases, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001; 4. Institute of Medical Systems Biology, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808)

Abstract: *Ophiocordyceps sinensis* is a characteristic rare medicinal herbs from the Tibet plateau, which grows in the extreme environment of alpine hypoxia and has very important economic and research value. For a long time, study on *Ophiocordyceps sinensis* has been the focus of academic circles, but its developmental mechanism remained unclear and is unable to be artificially cultivated, and its related sustainable progress is limited because of the unique developmental characteristics. In this paper, based on long-term work of our team, problems existing in the study of *Ophiocordyceps sinensis* and present situation were reviewed, in order to provide a theoretical basis for protection and utilization of the precious natural resources.

Keywords: *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc; Tibet plateau; *Thitarodes* insect; plant; development