冬虫夏草生物系统学研究进展

雷 桅[1,2],税晓容[1]

(1.广东医学院 附属医院心血管病研究室,广东 湛江 524001;2.中山大学 生命科学学院,广东 广州 510275)

摘 要:冬虫夏草是青藏高原特色名贵中药材,是其无性型中国被毛孢寄生于蝙蝠蛾科幼虫后形成的虫生子囊真菌,具有极高的经济和科研价值。对冬虫夏草遗传种质的明确和鉴定是深入开展科学研究和资源开发的基础,现从冬虫夏草的命名、分类、无性型、遗传多态性及地理分化等方面介绍了冬虫夏草的生物系统学进展,以期为这一珍贵真菌资源的生物学研究和可持续利用提供理论参考。

关键词:冬虫夏草;中国被毛孢;寄主昆虫;生物系统学;青藏高原

中图分类号:S 646;S 602 **文献标识码**:A **文章编号**:1001－0009(2014)14－0193－04

冬虫夏草[*Ophiocordyceps sinensis*(syn. *Cordyceps sinensis*)]是青藏高原特色名贵药材,其自然资源十分稀少,仅分布于青藏高原上,主要包括不丹、印度和尼泊尔等国的北部喜马拉雅山脉区域,以及中国青海、西藏、甘肃、云南和四川的高寒草甸及高寒灌丛草甸。从15世纪至今,作为东方世界里最昂贵的蕈菌,冬虫夏草具有十分重大的药用和经济价值,与人参、鹿茸并称为著名的“中药三宝”,是青藏高原中东部农牧民的主要经济来源之一。

1 冬虫夏草定名的变革

冬虫夏草,地方名是yartsa gunbu,英文名是aweto,或者自中文直译为summer grass winter worm和dongchong xiacao,学名原为*Cordyceps sinensis*(Berk.)Sacc,现修正为*Ophiocordyceps sinensis*(Berk.) Sung,Sung,Hywel-Jones & Spatafora。这些名称各自适用于不同场合,如yartsa gunbu是藏语音译词,会在一些英文科普文献中出现;aweto是英式传统用语,现在已非常少见;而summer grass winter worm和dongchong xiacao在英文环境中广泛采用,前者是冬虫夏草的意译词,后者是音译词。

原学名*Cordyceps sinensis*(Berk.)Sacc,如果直译过来的话应该叫“中国虫草”或“中华虫草”,原来的命名人是Berkeley,后来由Saccardo更正,或重新定名。最早在1723年,由欧洲传教士尚加特利茨库把从中国西北地区出产的冬虫夏草带到了法国,由Eaumur在法国科学院的学士大会作了介绍和报告,并刊登在会议纪要上。至1843年,Berkeley鉴定了来自中国广东的冬虫夏草,正式定名为:中国虫草*Sphaeri sinensis* Berkeley。1878年,Saccardo进行了分类学调整,将*Sphaeri*属并入虫草属*Cordyceps*,此后中国冬虫夏草的学名定为:*Cordyceps sinensis*(Berk.)Sacc.。该拉丁学名沿用到今天,并且使用频率非常高,在药理学、药物化学、生物多样性保护和农业经济学等领域一直担任主角[1-2]。

现学名*Ophiocordyceps sinensis*是系统进化生物学研究的结果,Sung等[3]经过一系列的系统进化分析和物种聚类研究,对原麦角菌科Clavicipitaceae虫草属*Cordyceps*进行了重新调整,从而将冬虫夏草更名为*Ophiocordyceps sinensis*,目前它与原学名作为同义词并存使用,主要出现在近年的基础生物学和生态学研究及其文献报道中。

2 冬虫夏草的系统分类学研究

2.1 冬虫夏草的分类

根据现行的分类系统,冬虫夏草隶属于菌物界Fungi、双核亚界Dikarya、子囊菌门Ascomycota、盘菌亚门Pezizomycotina、粪壳菌纲Sordariomycetes、肉座菌目Hypocreales、蛇形虫草科Ophiocordycipitaceae、蛇形虫草属*Ophiocordyceps*。到目前为止,全世界已报道的虫草属*Cordyceps*真菌达400多种,其中我国记载的有90多种。该属绝大多数真菌能感染昆虫,并从其头部或体表长出子座,从而形成虫菌复合体-虫草。

2.2 冬虫夏草属系统分类的历史

1823年Fries在球壳菌属(*Sphaeria*)中建立了虫草族Trib. *Cordyceps* Fr.,1833年Link建议成立虫草

第一作者简介:雷桅(1982-),男,博士,现主要从事冬虫夏草发生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);广东省自然科学基金资助项目(S2013040012115)。

收稿日期:2014－04－16

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

属[4],1941 年 Kobayasi[5]将虫草属分为 *Ophiocordyceps*、*Eucordyceps* Kobayasi 和 *Neocordyceps* Kobayasi 3 个亚属,1949 年 Mourreau 把虫草属分为 3 个亚属:*Torrubiella*、*Eucordyceps*、*Ophiocordyceps*,1958 年 Mains[6]将虫草属分为 *Cordyceps*、*Racemmella*(Ces.) Sacc.、*Ophiocordyceps*(Petch)Kobayasi 和 *Crytocordyceps* Mains 4 个亚属,1983 年 2 位日本人小林义雄和清水大典通过形态图形化描述对虫草属进行了系统介绍[7],1986 年 Eriksson 提出成立 *Bolacordyceps* O. Eriksson 亚属,并将 *Phytocordyceps* C. H. Su et H. H. Wang 作为其同物异名,1997 年清水大典[8]对虫草属的分类进行了一些调整,并绘制出版了第二本《冬虫夏草菌图谱》;2007 年 Sung 等通过多基因的分子系统进化分析手段,将新虫草属 *Cordyceps* 归于虫草菌科 Cordycipitaceae,包括原虫草属中颜色鲜艳和子座肉质的种类,并新建蛇形虫草科 Ophiocordycipitaceae,下设蛇形虫草属 *Ophiocordyceps* Petch(包括原虫草属中暗黑色和子座坚韧的种类)、大团囊虫草属 *Elaphocordyceps*(包括原虫草属中寄生于大团囊菌的种类)和 *Metacordyceps*(包括无性型为绿僵菌属的相关真菌)。冬虫夏草就被归入新建的蛇形虫草科蛇形虫草属,因此其拉丁学名改为 *Ophiocordyceps sinensis*[9-10]。

3　冬虫夏草无性型的鉴定

在冬虫夏草子实体形成之前,以及人工培养和液体发酵等工业生产中所使用的冬虫夏草菌种均为其无性阶段,因而其菌种的确定至关重要。在 20 世纪很长一段时间里,关于冬虫夏草的无性型争议不断,难以定论,已报道的冬虫夏草无性型菌种有 22 个学名,涉及 13 个属,但这些"无性型"里相当一部分或许只是冬虫夏草生长过程中的杂菌和伴生菌,其与冬虫夏草的关系尚有待进一步验证[11-12]。

确定冬虫夏草无性型最经典、最可靠的方法是"科赫法则",即在人工条件下,将所分离获得的假定无性型菌种,接种感染寄主钩蝠蛾幼虫,诱发形成冬虫夏草子实体,并产生子囊孢子,从而完成有性生活史。但由于人工模拟实现假定无性型菌株侵染寄主幼虫,并诱发子座的过程极其困难,迄今为止正式报道能够培养出冬虫夏草子实体的案例仅有少数几个,且均不可重复。因此,通过研究冬虫夏草假定无性型与有性型子实体之间的相关性就成为一种判定和确证无性型归属地位的可行途径[13-14]。

刘作易等[15-16]从云南德钦白马雪山和人支雪山采集了新鲜冬虫夏草标本,对其子囊孢子微循环产孢进行观察研究,并与子囊孢子和组织分离菌株的产孢结构进行对比。结果表明,微循环产孢的产孢结构和分离菌株的产孢结构相似,且与中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)的产孢结构也相似,由此证明冬虫夏草的无性型应该是中国被毛孢,而中华束丝孢(*Synnematium sinensis*)为中国被毛孢的同物异名种。

分子标记技术能够为冬虫夏草无性型的确定提供可靠的系统发生学证据和遗传学依据,而且操作便捷快速。目前使用较多的有 RAPD 和 AFLP,若二者的指纹图谱相似率很高(超过 90%以上),可基本确定分离获得的假定无性型就是实际的无性型。李增智等[17]从冬虫夏草子实体上分离到中国被毛孢,利用 RAPD-PCR 技术制作了冬虫夏草和中国被毛孢相应基因组的 DNA 指纹图谱,经比较后发现二者相似率高达 96%,从而说明冬虫夏草的无性型应该为中国被毛孢。赵锦等[18]则采用 ITS rDNA 序列作为分子标记,对冬虫夏草的有性和无性阶段进行系统发生学比较分析,从遗传学水平上证明冬虫夏草的无性阶段是中国被毛孢 *H. sinensis*。

2005 年在中国菌物学会主办的"冬虫夏草及其无性型研讨会"上,与会专家代表终于达成一致意见:冬虫夏草的无性型是中国被毛孢[19]。而且研究证明来自西藏、青海、四川和云南等所有出产地的冬虫夏草均为同一菌种,其无性型也同为中国被毛孢[15-17,20-22]。因此,随着研究的深入,中国被毛孢是冬虫夏草的无性型的观点,已经被学术界绝大多数人所采纳和接受。

4　冬虫夏草的遗传多态性与地理分化

对冬虫夏草起源和扩散的认识有助于冬虫夏草野生资源的保护,冬虫夏草种群遗传学与地理分布的研究近年也有一定的进展。中科院刘杏忠课题组通过对采自青藏高原不同地域的 56 个冬虫夏草样品的 ITS nrDNA 序列和交配型基因 MAT 1-2-1 序列进行分析,发现冬虫夏草种群在青藏高原上表现出显著的南北分化特征。南部种群的多样性指数明显高于北部,且在一个南部冬虫夏草样品中发现存在 ITS 异质性现象,并初步推测出西藏南部的林芝地区是冬虫夏草的起源中心,从该地区向整个青藏高原扩散蔓延。该研究表明地理因素是冬虫夏草种群分化和遗传演化的重要原因之一,在研究冬虫夏草资源保护和可持续利用等课题时应充分重视高原南部,尤其是林芝地区[23]。

复旦大学陈家宽课题组重点对冬虫夏草主产区的青海省进行了研究,通过采集 11 个县的冬虫夏草样品,开展了青海冬虫夏草的遗传变异及亲缘关系的形态性状和 ISSR 多态性分析。不同地区生长的冬虫夏草无论是形态性状还是 ISSR 多态性都表现出很大的遗传变异,说明其具有明显的地域相关性。根据形态学指标,青海产区的冬虫夏草大致分成 3 个地理种群组,即环青海湖地区、青海中东部和南部地区。而 ISSR 指纹图谱的研究则显示青海省的冬虫夏草可分为环青海湖地区和其它地区两大类,并且其它地区的大类又可细分成青

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

海南部、中部和东部产区等平行分支[24]。

最近,冬虫夏草的全基因组测序终于完成,通过比较基因组分析,发现冬虫夏草与其它虫生真菌之间具有较近的进化关系,但也存在大量转座子重复序列而使得其基因组比近缘昆虫病原真菌显著偏大,同时编码基因数量却减少30%以上,从而表现出典型的共生真菌而非病原菌特性。此外,不同于其它真菌种类,冬虫夏草的单倍体基因组含有2种互补的交配型基因,说明其单倍体细胞具备独立有性生殖及进行有性发育的能力,这可能与冬虫夏草所处的特殊生态环境密切相关[25]。

冬虫夏草是青藏高原特色中药材,是中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)寄生于鳞翅目(Lepidoptera)蝠蛾科(Hepialidae)钩蝠蛾属(*Thitarodes*)幼虫后形成的虫生子囊真菌,具有极高的药用和经济价值,而对其遗传种质的明确和鉴定是开展进一步科学研究和资源开发的基础,因此充分认识冬虫夏草的生物系统学进展具有十分重要的意义[26]。目前对冬虫夏草的遗传学和分类学仍存在较多争议和困惑[27-28],其原因一方面是由于冬虫夏草无法实现全过程的实验室研究,而另一方面又因为其极端恶劣的自然栖息环境限制了人类的认识。

参考文献

[1] 张平. 虫草属真菌研究进展[J]. 生物学杂志,2003,20(6):43-45.

[2] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1997.

[3] Sung G H,Sung J M,Hywel-Jones N L,et al. A multi-gene phylogeny of *Clavicipitaceae* (*Ascomycota*, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2007,44(3):1204-1223.

[4] 宋斌,林群英,李泰辉,等. 中国虫草属已知种类及其分布[J]. 菌物研究,2006,4(4):10-26.

[5] Kobayasi Y. The genus *Cordyceps* and its allies[J]. Science Reports of the Tokyo Bunrika Daigaku,Section B,1941,5(84):53-267.

[6] Mains E B. North American entomogenous species of *Cordyceps*[J]. Mycologia,1958,50(2):169-222.

[7] 小林义雄,清水大典. 冬虫夏草菌图谱[M]. 大阪:保育社,1983:1-280.

[8] 清水大典. 冬虫夏草菌图谱[M]. 大阪:大阪社,1983:1-446.

[9] 钟欣. 冬虫夏草无性型中国被毛孢与高寒植物根系关系的研究[D]. 广州:中山大学,2010.

[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] Ren S Y,Yao Y J. Evaluation of nutritional and physical stress conditions during vegetative growth on conidial production and germination in *Ophiocordyceps sinensis*[J]. FEMS Microbiol Lett,2013,346(1):29-35.

[12] Lei W,Li S,Peng Q,et al. A real-time qPCR assay to quantify *Ophiocordyceps sinensis* biomass in *Thitarodes* larvae[J]. J Microbiol,2013,51(2):229-233.

[13] 于洪飞. 冬虫夏草无性型鉴定的几种方法[J]. 安徽农业科学,2006,34(12):2763-2787.

[14] Yue K,Ye M,Lin X,et al. The Artificial Cultivation of Medicinal Caterpillar Fungus,*Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes): A Review[J]. Int J Med Mushrooms,2013,15(5):425-434.

[15] 刘作易,梁宗琦,刘爱英. 冬虫夏草子囊孢子萌发及其无性型观察[J]. 贵州农业科学,2003,31(1):3-5.

[16] Liu Z. Molecular evidence for the anamorph-teleomorph connection in *Cordyceps sinensis*[J]. Mycological Research,2001,105(7):827-832.

[17] 李增智,黄勃,李春如,等. 确证冬虫夏草无性型的分子生物学证据I. 中国被毛孢与冬虫夏草之间的关系[J]. 菌物系统,2000,19(1):60-64.

[18] 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.

[19] 曾纬,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.

[20] 章卫民,李泰辉,陈月琴,等. 西藏冬虫夏草无性型的分子生物学研究[J]. 微生物学通报,2002,29(3):54-58.

[21] 陈仕江,尹定华,李黎,等. 西藏那曲冬虫夏草无性型的研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(7):453-454.

[22] Chen Y Q,Wang N,Qu L H,et al. Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA[J]. Biochemical Systematics and Ecology,2001,29:597-607.

[23] Zhang Y J,Xu L L,Zhang S,et al. Genetic diversity of *Ophiocordyceps sinensis*,a medicinal fungus endemic to the Tibetan Plateau: Implications for its evolution and conservation[J]. BMC Evolutionary Biology,2009,16:290.

[24] 郝剑瑾,程舟,梁洪卉,等. 基于rDNA ITS序列探讨我国冬虫夏草的遗传分化及分布格局[J]. 中草药,2009,40(1):112-116.

[25] Hu X,Zhang Y J,Xiao G H,et al. Genome survey uncovers the secrets of sex and lifestyle in caterpillar fungus[J]. Chinese Science Bulletin,2013,58(23):2846-2854.

[26] 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,2010.

[27] 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]. Microbiol Res,2013,168(8):525-532.

[28] Zhang S,Zhang Y J,Liu X Z,et al. On the reliability of DNA sequences of *Ophiocordyceps sinensis* in public databases[J]. J Ind Microbiol Biotechnol,2013,40(3-4):365-378.

Study Advances on Biosystematic of *Ophiocordyceps sinensis*

LEI Wei[1,2],SHUI Xiao-rong[1]

(1. Cardiovascular Disease Research Lab,Affiliated Hospital of Guangdong Medical College,Zhanjiang,Guangdong 524001;2. College of Life Science,SUN YAT-SEN University,Guangzhou,Guangdong 510275)

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

西瓜嗜酸菌分泌系统的研究进展

安　心[1,2]，王铁霖[2]，杨玉文[2]，唐爽爽[1]，刘志恒[1]，赵廷昌[2]

(1.沈阳农业大学 植物保护学院，辽宁 沈阳 110161；2.中国农业科学院 植物保护研究所，北京 100193)

摘　要：植物病原细菌多为革兰氏阴性菌。细菌的分泌系统与其致病性有密切的联系，其研究对揭示植物病原细菌的致病机理具有重要意义。现从细菌分泌系统、西瓜嗜酸菌致病机理及Ⅱ型和Ⅲ型分泌系统与西瓜嗜酸菌致病性之间的关系等角度出发，重点阐述了与西瓜嗜酸菌分泌系统有关的功能基因，为进一步研究西瓜嗜酸菌的作用机理及寻找其致病性靶标提供理论依据。

关键词：西瓜嗜酸菌；T2SS；T3SS；功能基因；致病性

中图分类号：S 651　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1001－0009(2014)14－0196－04

瓜类细菌性果斑病是种传细菌性病害，其病原菌为西瓜嗜酸菌(*Acidovorax citrulli*)[1]。西瓜嗜酸菌为革兰氏阴性菌，常引起西瓜、甜瓜和南瓜等葫芦科重要经济作物的果斑病(Bacterial fruit blotch，BFB)。在我国，该病害于1998年首次报道[2]，相继在新疆维吾尔族自治区和内蒙古自治区[3]、吉林省[4]和山东省[5]等十几个省区相继发生，目前已经成为我国西、甜瓜生产上的重要病害。由于该病病原细菌种内的多样性及其与寄主、环境相互作用的复杂性，使该病害难以得到有效防治[6]。

迄今为止尚未发现对瓜类细菌性果斑病免疫或高抗的品种，故研究该病病原菌的致病机理尤为重要。革兰氏阴性菌是通过几种固定的蛋白分泌系统来分泌效应因子，目前研究较为深入的主要有Ⅰ～Ⅵ型6种蛋白分泌系统，与病原菌的致病性有密切的联系，其研究对揭示植物病原细菌的致病机理有重要意义。现从细菌分泌系统、西瓜嗜酸菌致病机理及Ⅱ型和Ⅲ型分泌系统与西瓜嗜酸菌致病性之间的关系等角度出发，重点阐述了与西瓜嗜酸菌分泌系统有关的功能基因，以期为进一步研究西瓜嗜酸菌的作用机理及寻找其致病性靶标提供理论依据。

1　细菌的分泌系统

革兰氏阴性菌是通过几种固定的蛋白分泌系统来分泌效应因子。其中Ⅰ型、Ⅲ型、Ⅳ型和Ⅵ型分泌系统的结构相似，它们的装置都是横跨细菌内膜-周质-外膜，可以一步将外泌蛋白分泌到细胞膜外膜[7-11]。而另外的一些蛋白第一步则需要通过通用型的分泌系统分泌到周质间隙，再通过Ⅱ型、Ⅴ型或者极少数通过Ⅰ型、Ⅳ型分泌途径穿过外膜。并且一步蛋白分泌系统的转位蛋白都缺少N-端信号肽序列，这就区别了Ⅱ型分泌系统、Ⅴ型分泌系统。后2种分泌系统需要通过一般分泌途径(Sec-pathway)或双精氨酸分泌途径(Tat-pathway)将蛋白转运出细胞内膜，并且它们需要识别分泌蛋白N-端信号肽序列[12-14]。

2　西瓜嗜酸菌Ⅲ型分泌系统与致病性

Ⅲ型分泌系统(Type Ⅲ secretion system，T3SS)广泛地存在于动、植物病原细菌中，是目前已知的最为复杂的蛋白分泌系统，整个分泌系统需要多种蛋白的参与[15]。T3SS是非Sec依赖性的，作为一步分泌系统的它，分泌的蛋白质不在周质中停留，而是直接从细菌细

第一作者简介：安心(1990-)，女，硕士研究生，研究方向为分子植物病理学。E-mail：422704011@qq.com.

责任作者：赵廷昌(1964-)，男，博士，研究员，现主要从事分子植物病理学等研究工作。E-mail：tingchangzhao@gmail.com.

基金项目：国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201003066)；国家西甜瓜产业技术体系资助项目(CARS-36)。

收稿日期：2014－03－25

Abstract：*Ophiocordyceps sinensis*，an entomogenous fungus parasitic in the larvae of ghost moths(Lepidoptera)，has always been used as one of the most valued Traditional Chinese Medicines from Tibetan Plateau. Identification of *Ophiocordyceps sinensis* genetic germplasm is the basis of scientific research and resource development. Therefore，the biosystematic advances of *O. sinensis* including denomination，classification，anamorph，genetic diversity and geographical differentiation were introduced，aiming to provide the theoretical references to biological researches and sustainable use of this precious mushroom.

Key words：*Ophiocordyceps sinensis*；*Hirsutella sinensis*；host insect；biosystematics；Tibetan plateau

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn