

## 台湾线虫草单次生子囊孢子菌株交配型基因的初步研究

周春影<sup>1</sup>, 叶朝宗<sup>2</sup>, 张磊<sup>1</sup>, 曹玉朋<sup>1</sup>, 张颖裕<sup>1</sup>, 李春如<sup>1\*</sup>

(1. 安徽农业大学微生物防治省重点实验室, 合肥 230036; 2. 安徽省东至县花园乡林业站, 东至 247200)

**摘要:**首次对台湾线虫草无性型—黄山被毛孢菌株的交配型基因进行了较为系统的研究。采用稀释涂布平板法和显微定位法获得台湾线虫草的单次生子囊孢子, 并对单次生子囊孢子菌株的交配型基因进行 PCR 扩增和子实体人工诱导实验。结果表明, 在 34 株单次生子囊孢子菌株中, 14 个菌株含有 *MATI-1* 基因, 4 个菌株含有 *MATI-2* 基因, 其余 16 个菌株同时含有 *MATI-1* 和 *MATI-2* 基因; 人工诱导子实体的结果显示, 含有 2 种交配型基因的菌株可以生长出更多的子实体。提示台湾线虫草的交配类型可能为同宗配合。

**关键词:** 台湾线虫草; 单次生子囊孢子; 交配型基因; 同宗配合

中图分类号: S476.12

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)01-0134-05

### Preliminary studies on the mating-type gene of strains from single secondary ascospores of *Ophiocordyceps formosana*

ZHOU Chunying<sup>1</sup>, YE Chaozong<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup>, CAO Yupeng<sup>1</sup>, ZHANG Yingyu<sup>1</sup>, LI Chunru<sup>1</sup>

(1. Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Huayuan Forestry Station of Dongzhi County, Dongzhi 245108)

**Abstract:** The mating-type gene of the strains of *Hirsutella huangshanensis*, the anamorph of *Ophiocordyceps formosana*, was systematically studied for the first time. The spread plate method and the micro position method were used to obtain the single secondary ascospores. The mating-type genes in 34 isolates were amplified by PCR and their fruiting bodies were also artificially induced. The results revealed that 14 strains had *MATI-1*, 4 strains had *MATI-2*, and 16 strains had both *MATI-1* and *MATI-2* mating-type genes. The artificial induction of the fruiting body showed that the strains contained two mating type genes that can form more fruiting bodies. It was suggested that the mating type of *Ophiocordyceps formosana* may be the homothallism.

**Key words:** *Ophiocordyceps formosana*; secondary ascospore; mating-type gene; homothallism

台湾线虫草 *Ophiocordyceps formosana* Kobayashi & Shimizu 于 1981 年在台湾被首次发现, 2002 年发现该虫草在中国大陆的黄山地区也有分布<sup>[1]</sup>, 并应用经典分离方法得到其无性型, 经形态和分子生物学方法鉴定该无性型为一被毛孢属新种, 命名为黄山被毛孢 *Hirsutella huangshanensis* C. R. Li, M. Z. Fan & Z. Z. Li<sup>[2-3]</sup>。已报道文献中, 研究主要集中在对台湾线虫草成分、生物活性及人工子实体培育的研究上, 而台湾线虫草的交配型研究还未见报道。

由于交配型基因控制着虫草属真菌的有性生殖

和子实体的形成, 所以近些年来越来越受到学者们的关注和研究<sup>[4-5]</sup>。不同的真菌具有不同的有性生殖方式。位于 Mat 位点上的交配型基因 *MATI-1* 或 *MATI-2* 控制着异宗配合、同宗配合和假同宗配合之间的相互转变<sup>[6-7]</sup>。

本试验在前人研究的基础之上分离得到了 34 株台湾线虫草单次生子囊孢子菌株, 并对其交配型基因进行 PCR 扩增、测序和序列分析, 以期推测出台湾线虫草的交配型类型。同时结合台湾线虫草子实体培养, 观察不同交配型基因菌株的子实体生长

收稿日期: 2014-02-26

基金项目: 国家自然科学基金 (30570004), 国家高技术研究发展计划资助项目 (863 计划) (No. 2007AA021506) 和教育部留学回国人员科研启动基金 (2009 年) 共同资助。

作者简介: 周春影, 硕士研究生。

\* 通信作者: 李春如, 博士, 教授。E-mail: chunruli@hotmail.com

情况, 初步探究台湾线虫草的子实体形成与交配型基因的关系, 为台湾线虫草的大规模人工培养提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株及其来源** 供试的 34 个黄山被毛孢菌株均分离自 2012 年 8 月采自黄山地区的台湾线虫草, 菌株编号为 FCC01~FCC34, 保存于安徽农业大学微生物防治省重点实验室。

**1.1.2 主要培养基** (1) 水琼脂分离培养基: 琼脂粉 20 g, 加蒸馏水至 1000 mL。1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min, 灭菌结束冷却至 50℃ 左右加入 0.04% 的青霉素和 0.1% 的盐酸链霉素。

(2) PDA 分离培养基: 去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加水煮沸 20 min, 纱布过滤, 另加葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 加蒸馏水至 1000 mL。1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min, 灭菌结束冷却至 50℃ 左右加入 0.04% 的青霉素和 0.01% 的盐酸链霉素。

(3) SDAY 培养基配方: 葡萄糖 40 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸出粉 10 g, 琼脂 20 g, 加蒸馏水至 1000 mL, pH 自然, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

(4) 虫草专用培养基: 去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加水煮沸 20 min, 纱布过滤, 另加葡萄糖 10 g, 麦芽糖 10 g, 蛋白胨 10 g, MgSO<sub>4</sub> 1.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, 柠檬酸三铵 0.4 g, 复合维生素 B 4 片, 加蒸馏水至 1000 mL, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

**1.1.3 主要仪器设备** Olympus 显微操作仪及电脑图像采集系统(Olympus IX71), Flexigene PCR 仪(PTC-240), 恒温振荡培养箱(HZQ-F160), 高速分散器(PT3100), 辅助移液器(Motorized Pipetting Aid), 人工气候培养箱(RXZ-280B)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 单次生子囊孢子菌株的分离** 取采集的新鲜台湾线虫草标本, 将其虫体部分用脱脂棉保湿, 以促进子座成熟和子囊孢子弹射。将处理好的标本置于放有载玻片的灭菌平皿中, 让子座头部悬于载玻片上, 25℃ 保湿培养。取弹射有子囊孢子(次生子囊孢子)的载玻片, 在超净工作台里用无菌水将载玻片上的子囊孢子(次生子囊孢子)洗入装有 0.05% Tween-80 无菌水的小三角瓶中, 充分振荡使其分散。经血球计数板计数后, 稀释到约 10<sup>6</sup> 个·mL<sup>-1</sup>。取 100 μL 孢子悬浮液涂布在水琼脂分离培养基平板上, 25℃ 避光培养。使用 OLYMPUS 显微操作仪圈定平板上次生子囊孢子的位置并定期观

察记录单次生子囊孢子的萌发生长过程, 将已萌发的单个次生子囊孢子(图 1-B)在超净工作台中转接到 SDAY 斜面培养基中, 使每试管接 1 个孢子, 25℃ 培养至形成单菌落, 即为单次生子囊孢子菌株, 依次标记 FCC01、FCC02 和 FCC34。单次生子囊孢子菌株用 SDAY 斜面培养基于 4℃ 冰箱内保存备用。

**1.2.2 单次生子囊孢子菌株 DNA 的提取** 将已经纯化得到的黄山被毛孢菌株接种到 SDAY 培养基上, 置于 25℃ 培养箱中培养 30 d 左右, 刮取菌丝, 液氮研磨至粉状, 利用改良的氯化苜法提取 DNA<sup>[8]</sup>。

**1.2.3 MAT1-1 和 MAT1-2 交配型基因片段的扩增** GenBank 数据库中还没有收录台湾线虫草交配型基因的序列, 所以无法下载并设计引物。由于蛹虫草的交配型基因的研究比较成熟, 且蛹虫草与台湾线虫草同属于虫草属, 两者的无性型也同属于麦角菌科, 因此便使用谭琦等人设计的扩增蛹虫草交配型基因的引物<sup>[5]</sup>, 分别扩增 MAT1-1、MAT1-2 基因片段(表 1)。

表 1 扩增台湾线虫草交配型基因的特异性引物

Table 1 Specific primer pairs for the <i>O. formosana</i> mating-type genes		
基因类型	引物	序列 5'→3'
Gene type	Primer pair	Sequence 5'→3'
MAT1-1	MAT1-1F	ATGGAACACAGATCGAGCGACAC
	MAT1-1R	ATATACCTTCGCGATCATTGCCAG
MAT1-2	MAT1-2F	ATGGATCTGCAACTGGATCGGACCA
	MAT1-2R	CTACATGATTGACTCCGGGCTCATTG

以提取的单孢菌株 DNA 为模板, 以 2 对引物扩增不同类型的交配型基因。50 μL PCR 反应体系: PCR 水 38.4 μL, 10×Buffer 5 μL, 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 1 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 上下游引物各 1 μL, Taq 酶 0.6 μL。反应条件: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 48~52℃ (根据引物的 T<sub>m</sub> 确定) 退火 60 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 32 个循环; 最后于 72℃ 补平 7 min。PCR 反应在 TGRADIENT 公司的 Biometra 扩增仪上进行。扩增产物用 1% 琼脂糖电泳检测。扩增产物的纯化与测序均由 Invitrogen 公司(上海英俊生物技术有限公司)完成, 使用 DNA 自动测序仪测序。

**1.2.4 不同交配型菌株子实体人工培养** 分别将 34 株供试菌株接种于虫草专用米饭培养基中, 25℃ 下培养 90 d 后观察子实体生长状况。具体方法参见文献[9]。

## 2 结果与分析

### 2.1 单次生子囊孢子形态和萌发

台湾线虫草单次生子囊孢子呈柱状, 在水琼脂

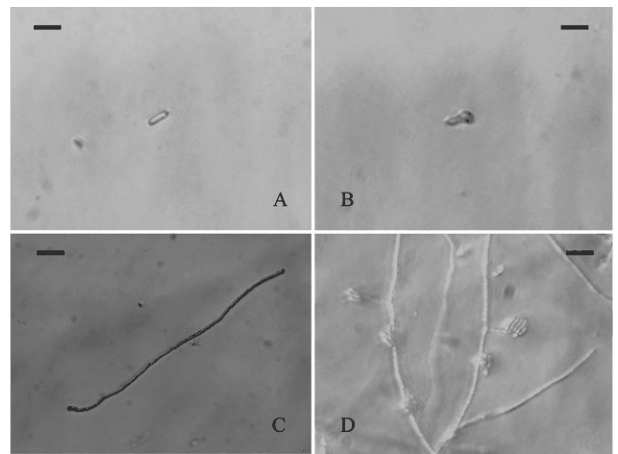
分离培养基 25℃培养 3~7 d 后,大部分次生子囊孢子开始萌发,之后一端继续伸长,生长缓慢,40 d 左右肉眼可见微菌落,呈灰白色,产生分生孢子,2~6 个聚集成团,外被粘液层,分生孢子单孢、无色、光滑、柱状(图1)。

2.2 交配型基因 PCR 扩增结果与分析

通过 PCR 方法鉴定实验分离获得的 34 株单次生子囊孢子菌株的交配型基因类型,结果如图 2 和图 3 所示。统计扩增结果表明:34 株单次生子囊孢子菌株中有 16 株同时含有 *MATI-1* 和 *MATI-2* 2 种类型的交配型基因,14 株只含有 *MATI-1* 基因,4 株只含有 *MATI-2* 基因(表 2)。

2.3 *MATI-1* 和 *MATI-2* 基因序列的分析

2.3.1 *MATI-1* 基因序列分析 分别对 RCEF0868、16 号、20 号、28 号、31 号、32 号、33 号和 34 号菌株的 *MATI-1* 基因测序,大小均在 865 bp 左右。将所扩增出的 8 个实验菌株的 *MATI-1* 基因序列在 NCBI 中 Blastn 比对,结果显示:RCEF0868、16 号、31 号、32 号、33 号和 34 号的序列同源性很高,如 16 号与 32 号比对覆盖率(cover)达到 94%,Max ident 达到 99%。但是 20 号与 28 号 2 株菌与其他菌株略有差别,如 16 号与 28 号比对覆盖率只有 75%,Max ident 达到 100%。该结果说明这 8 个序列的同源性很高。



A: 单次生子囊孢子; B: 开始萌发; C: 形成菌丝; D: 产生分生孢子

A: Single secondary ascospore; B: Germination; C: Formation of hyphae; D: Generation of conidia

图 1 台湾线虫草单次生子囊孢子的生长过程

Figure 1 Development of the single secondary ascospore of *O. formosana*. (Bar =10 μm)

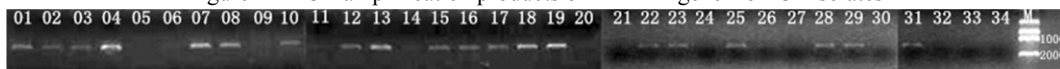
在比对中发现实验得到的序列与国外报道的 3 个蛹虫草 *MATI-1-1* 基因序列(登录号分别为 AB255607、AB194982、AB124614)比对同源性最高(前 3 个),然而其比对覆盖率只有 8%左右,而且 score 值也较低,均为 46.4,这预示着 *MATI-1* 基因序列在同为虫草属的不同种之间的差异较大。



M: DNA标准分子量 M: DNA marker

图 2 34株单孢菌的*MATI-1*基因PCR扩增结果电泳图

Figure 2 PCR amplification products of *MATI-1* gene from 34 isolates



M: DNA标准分子量 M: DNA marker

图 3 34株单孢菌的*MATI-2*基因PCR扩增结果电泳图

Figure 3 PCR amplification products of *MATI-2* gene from 34 isolates

表 2 PCR 鉴定台湾线虫草单次生子囊孢子菌株携带的交配型基因类型

Table 2 The mating-type gene of sexual single-spore isolates from *O. formosana*

携带交配型基因的种类 Mating-type gene carried by sexual single-spore isolate	菌株数 Strain number
<i>MATI-1</i>	14
<i>MATI-2</i>	4
<i>MATI-1</i> and <i>MATI-2</i>	16

2.3.2 *MATI-2* 基因序列分析 分别对 RCEF0868、01 号、10 号、15 号、18 号、22 号、25 号、28 号和

31 号菌株的 *MATI-2* 基因进行测序,大小均在 1200 bp 左右。将所扩增出的 8 个实验菌株的 *MATI-2* 基因序列在 NCBI 中 Blastn 比对,结果显示这 10 个基因的同源性非常高,只有个别碱基有差异。

在比对中发现与一段蛹虫草的 *MATI-2-1* 基因序列(AB084257)相似度最高,虽然覆盖率只有 20%,但是 score 值达到了 446。此外与细脚拟青霉(AB084921),玫烟色拟青霉(AB095037)还有大蝉草(AB095035)等 *MATI-2* 序列相似度较高,这预示着 *MATI-2* 基因序列在同为虫草属的不同种之间的差异较 *MATI-1* 基因要小。

表 3 不同交配型基因菌株的子实体和孢梗束总鲜重差异

Table 3 The total fresh weight of fruiting bodies and synnemata of strains with different mating-type genes

<i>MATI-1</i>	总鲜重/g Total fresh weight	<i>MATI-2</i>	总鲜重/g Total fresh weight	Both	总鲜重/g Total fresh weight
05 号 No.05	0	01 号	0.253	02 号	3.828
	0		0.289		3.612
06 号 No.06	0.381	13 号	3.136	03 号	0
	1.159		1.346		0
09 号 No.09	0	17 号	0	04 号	0.315
	0		0		1.268
11 号 No.11	0.020	18 号	0	07 号	0
	1.370		0		0
14 号 No.14	0.292			08 号	0
	0.338				0
20 号 No.20	1.110			10 号	0.940
	0.763				2.087
21 号 No.21	1.036			12 号	1.884
	1.162				0.082
24 号 No.24	0			15 号	5.177
	0				5.714
26 号 No.26	0.120			16 号	0.366
	0.249				0.374
27 号 No.27	1.290			19 号	1.110
	0.100				0.859
30 号 No.30	1.790			22 号	0.363
	1.821				3.026
32 号 No.32	0.070			23 号	1.261
	0.944				1.927
33 号 No.33	0			25 号	2.293
	0				3.335
34 号 No.34	0			28 号	0.536
	0				1.342
				29 号	5.585
					1.128
				31 号	2.748
					0.550
平均值/g Average	0.500±0.607 <sup>b</sup>	平均值/g Average	0.628±1.111 <sup>b</sup>	平均值/g Average	1.616±1.701 <sup>a</sup>

注: 不同字母按 Duncan 新复极差多重比较法, 在 5% 概率水平统计上呈显著差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: The data denoted by different letters are significantly different at the 0.05 level according to the Duncan's new multiple-range test.



A: FCC01 号; B: FCC30 号; C: FCC15 号 A: NO.FCC01; B: NO.FCC30; C: NO.FCC15

图 4 部分菌株的子实体生长状况

Figure 4 The fruiting body growth of some strains

#### 2.4 不同交配型菌株子实体人工培养的差异

由表 3 和图 4 可知, 含有不同交配型基因的菌株子实体生长能力有显著差别。含有 2 种交配型基因

的菌株 16 株中有 13 株能形成子实体, 子实体和孢梗束总鲜重最高, 达到  $1.616 \text{ g} \cdot \text{瓶}^{-1}$ 。含有 *MATI-1* 基因的菌株 14 株中有 9 株能形成子实体, 但子实体和

孢梗束总鲜重最小,仅为  $0.500 \text{ g}\cdot\text{瓶}^{-1}$ 。含有 *MATI-2* 基因的菌株 4 株中有 2 株能形成子实体,子实体和孢梗束总鲜重为  $0.628 \text{ g}\cdot\text{瓶}^{-1}$ 。因此,含有 2 种交配型基因的菌株能形成更多的台湾线虫草子实体。

### 3 讨论

真菌的交配型是控制其交配亲和性和有性生殖的遗传基础。已知真菌的交配型系统分为同宗配合和异宗配合 2 大类。同宗配合 (homothallism) 是一种自体可孕的有性生殖方式,即该真菌不需要 2 个不同来源的菌丝交配,只由同一有性孢子萌发生成的初级菌丝就可独立完成有性生活史。而异宗配合 (heterothallism) 是一种自体不孕的有性生殖方式,即由同一有性孢子萌发生成的初级菌丝不能够独立完成有性生活史,只有通过 2 个不同交配型的有性孢子萌发生成的初生菌丝之间的交配,才能完成有性生活史<sup>[10]</sup>,目前虫草菌中交配型研究得较为透彻的是蛹虫草与高雄山虫草,它们都是典型的二极性异宗配合菌。近年来国内研究学者通过 PCR 扩增等方法证实冬虫夏草是同宗配合菌,可独立完成有性生殖;其 *MATI-2* 基因位点位于保守的自行区间,但 *MATI-1* 基因可通过与可动遗传因子重组独立于 *MAT* 基因位点之外<sup>[11]</sup>。

交配型研究中能否得到单核体菌株是研究得以开展的重要前提,而单核体菌株的获得与能否得到单子囊孢子直接相关。虫草属的子囊孢子是由亲代细胞减数分裂而来的,为单倍体。台湾线虫草的次生子囊孢子是子囊孢子断裂而来,所以也是单倍体。因此本实验使用台湾线虫草的单次生子囊孢子作为实验材料是合理的。对于子囊菌而言,一般来说由单个子囊孢子或次生子囊孢子萌发产生的菌株若只含有 *MATI-1* 基因或 *MATI-2* 基因,那么该子囊菌就很可能是异宗配合,如蛹虫草;而如果既含有 *MATI-1* 基因又含有 *MATI-2* 基因,那么就很可能是同宗配合<sup>[12]</sup>,如冬虫夏草。本实验结果显示,34 株单次生子囊孢子菌株中 14 株只含有 *MATI-1* 基因,4 株只含有 *MATI-2* 基因,剩下的 16 株含有 2 种基因。经分析有 2 种可能性:一是在实验过程中出现了非单次生子囊孢子菌株;二是在转接过程中菌株发生了退化,丧失了部分交配型基因。前者基本可以排除,笔者倾向于后者。实验结果中 *MATI-1* 基因的总数为 30, *MATI-2* 基因的总数为 20,比值为 1.5:1,这与理论值 1:1 有一定的差距,可能与样本数偏少有关,另外也需采用新技术进行深入研究,

如可用 RT-PCR 和 RACE 获得交配型基因全长 cDNA,并通过 DNA 步移法扩增交配型基因侧翼未知 DNA 序列,检测 *MATI-1* 和 *MATI-2* 基因,并期待发现重要调控基因;应用 mRNA 差异显示技术,寻找与子实体形态建成相关的基因。Zheng 等人研究蛹虫草的交配型基因时发现 30 株单分生孢子菌株中只有 2 株含有 *MATI-2* 基因,很明显比值也不符合 1:1<sup>[13]</sup>,但他们并没有解释产生该现象的成因。综上所述,笔者认为台湾线虫草的交配型类型为同宗配合的可能性较大,部分菌株交配型基因可能存在丢失。

人工诱导台湾线虫草子实体实验表明,在相同适宜的条件下,同时含有 2 种交配型基因的菌株形成子实体的概率和子实体的产量均大于只含有 1 种交配型基因的菌株。该结果从侧面说明了虫草属真菌进行有性生殖和产生子实体是交配型基因这个内因和适宜的温度、湿度和培养基等一系列外因的协同作用。

### 参考文献:

- [1] Li C R, Fan M Z, Huang B, et al. The genus *Cordyceps* and its allies from Anhui[J]. *Mycosystema*, 2002, 21(2): 167-171.
- [2] 李春如,夏成润,林英任,等.台湾虫草的被毛孢无性型新种及其对黄粉虫的侵染研究[J].菌物学报,2005,24(3): 349-355.
- [3] 左登平,李春如,黄勃,等.台湾虫草及其无性型关系的分子确证[J].菌物学报,2008,27(2): 224-229.
- [4] Yokoyama E, Yamagishi K, Hara A. Structures of the mating-type loci of *Cordyceps takaomontana*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 5019-5022.
- [5] 谭琦,蔡涛,汪虹,等.蛹虫草无性孢子的交配型基因类型的分子鉴定[J].上海农业学报,2011,27(3): 5-8.
- [6] Zheng P, Xia Y, Zhang S, et al. Genetics of *Cordyceps* and related fungi[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(7): 2797-2804.
- [7] Ni M, Feretzaki M, Sun S, et al. Sex in fungi[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45: 405-430.
- [8] 朱衡,瞿峰,朱立煌,等.利用氯化苜蓿提取适于分子生物学分析的真菌 DNA[J].真菌学报,1994,13(1): 34-40.
- [9] 董建飞,肖岩岩,陈超,等.台湾虫草子实体人工培养条件的初步研究[J].中国微生物学杂志,2011,23(4): 298-301; 305.
- [10] 高新华.蛹虫草(*Cordyceps militaris*)的交配型研究[J].食用菌学报,2008,15(1): 1-5.
- [11] 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.
- [12] Coppin E, Debuchy R, Arnaise S, et al. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(4): 411-428.
- [13] Zheng P, Xia Y, Xiao G, et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine[J]. *Genome Biology*, 2011, 12(11): R116.