

研究报告

一蚁巢中束梗孢类昆虫病原真菌的多型现象 II. 隐存的一个多头束霉新种, 蚁生多头束霉

梁宗琦^{1*} 梁建东² 陈万浩¹ 韩燕峰¹ 邹晓¹

(1. 贵州大学生命科学学院 真菌资源研究所 贵州 贵阳 550025)

(2. 贵阳中医学院基础医学部 微生物学系 贵州 贵阳 550002)

摘要:【目的】探明在一个猛蚁 *Ponera* sp. 蚁巢罹病兵蚁上的一株束梗孢类昆虫病原真菌的分类地位。【方法】主要基于表型特征(特别是营养来源)结合分子系统学及拆分网络的组合分析。【结果】通过表型特征比较, 菌株 GZAC XCH-ant-710 以寄主为蚂蚁、较小的瓶梗(11.9–16.2) $\mu\text{m} \times 1.1 \mu\text{m}$ 和分生孢子(2.2–4.3) $\mu\text{m} \times 1.1 \mu\text{m}$ 与其他几种寄生昆虫的多头束霉已知种相区别。【结论】基于表型特征(特别是营养来源)与种的界定及进化关系的理论支持, 及多途径的组合分析揭示, 菌株 GZAC XCH-ant-710 是多头束霉属一新成员, 蚁生多头束霉 *Tilachlidium poneraticum*。

关键词: 多头束霉, 营养偏好, 分子系统发育, 系统发育网络

Phenotypic polymorphism of the stilbellaceous entomogenous fungi in an ant nest of *Ponera* II. A cryptic new *Tilachlidium* species, *Tilachlidium poneraticum*

LIANG Zong-Qi^{1*} LIANG Jian-Dong² CHEN Wan-Hao¹ HAN Yan-Feng¹ ZOU Xiao¹

(1. The Institute of Fungus Resources, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

(2. Department of Microbiology, School of Basic Medical Science, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract: [Objective] To identify the taxonomic status of a stilbellaceous entomopathogenic fungus collected on the soldier ant of *Ponera*. [Methods] The analysis mainly based on phenotypic traits (especially from the nutritional supplies), combined of molecular phylogeny and splits network. [Results] The strain GZAC XCH-ant-710 distinguished from the other *Tilachlidium* species by the ant host, the size of phialide and conidia, (11.9–16.2) $\mu\text{m} \times 1.1 \mu\text{m}$, (2.2–4.3) $\mu\text{m} \times 1.1 \mu\text{m}$, respectively. [Conclusion] The strain GZAC XCH-ant-710 is a new species, supported by the phenotypic traits (especially from the nutritional supplies), species delimitation, theory of evolutionary relationship, and multipath of combined analysis, and named *Tilachlidium poneraticum*.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31093440, 31493011, 31493010)

***Corresponding author:** E-mail: zqliang2@hotmail.com

Received: May 11, 2015; **Accepted:** July 28, 2015; **Published online** (www.cnki.net): September 09, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31093440, 31493011, 31493010)

***通讯作者:** E-mail: zqliang2@hotmail.com

收稿-日期: 2015-05-11; **接受日期:** 2015-07-28; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-09-09

Keywords: *Tilachlidium*, Nutritional preferences, Molecular phylogeny, Phylogenetic network

近年,从束梗孢类昆虫病原真菌中寻找一些新的具有生物活性的物质,如具抗菌活性的刺束霉素(Akanthomycin),具生物亲和性并刺激细胞因子IL-8生成的伤口愈合多聚物,福马甾醇(Formasterol) A、B, 5个新的棒束霉素(Isariotin)类似物^[1-2],以及一种多头束霉 *Tilachlidium* sp.形成的具抗菌和抗肿瘤活性的二酮哌嗪类化合物等^[3]。束梗孢类昆虫病原真菌的研究利用受到了人们更多的关注。

多头束霉属 *Tilachlidium* Preuss 是 Preuss (1851) 基于 *Tilachlidium pinnatum* Preuss 模式种建立的一个无性型属^[4]。无性型在子囊菌生活史中起着扩展生存空间的功能,它是真菌生活史的一部分。据估计在美国与植物有关的真菌中,大约有 50% 的有性型未知。在未来,真菌无性型的名称还会长期使用^[5]。

多头束霉属 *Tilachlidium* 与拟多头束霉属 *Tilachlidiopsis* Keissler 和多头霉属 *Polycephalomyces* Kobayasi 是一类形态特征相似的产孢梗束的丝状真菌(Synnematous hyphomycetes; stilbaceous fungus)。多头束霉属的主要特征是:孢梗束简单或分枝,柱状,向上变尖;瓶梗散生,锥形,向上变细,常顶生于孢梗束的菌丝,或作为孢梗束外围菌丝的侧细胞,单生,或 2-3 个聚集成群;分生孢子透明,常具粘液,能形成球形或不规则的孢子团^[6]。多头束霉现记载有 21 个分类单元,除去同物异名后仅有 16 个种(<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>, 2015)。它们大多数腐生于各种基质,少数种类寄生于昆虫。Petch (1931)介绍了一种寄生鳞翅目昆虫的种,幼虫多头束霉 *T. larvarum* Petch (现转属为幼虫顶头孢 *Acremonium larvarum* (Petch) W. Gams 1971),此菌具有锥形瓶梗,后来他认为 *Isaria brachiata* Fr.和它是同一种真菌^[7]。Mains^[6,8]将一种寄生鳞翅目昆虫,瓶梗锥形且孢子成团的分枝被毛孢 *Hirsutella ramose* Mains 移到了此属之中。迄今,能寄生昆虫的多头束霉有 4 个种。本文将首次报道

另一个寄生猛蚁兵蚁的多头束霉新种,蚁生多头束霉 *Tilachlidium poneraticum* Z.Q Liang, J.D Liang, W.H. Chen & Y.F. Han。

1 材料与方法

1.1 标本采集及形态学观察研究

标本采自贵阳市,小车河湿地公园同一猛蚁蚁巢中的多个罹病兵蚁(图 1),分别编号为 XCH-ant-706、XCH-ant-8、XCH-ant-L3、XCH-ant-722、GZAC XCH-ant-710 和 XCH-ant-03。这些标本用于形态描述鉴定及分子系统学分析。

从采集地获得的鲜标本带回实验室后立即拍照,并挑取小段孢梗束产孢区,制片。用装有 Motic 1300 数字照像系统的显微镜进行显微特征观察、描述、大小测定并拍照。显微照片的处理及标注采用 PhotoImpact 6.0 ESD 软件(Ulead Systems, Taipei, Taiwan)进行。

1.2 标本 DNA 提取、扩增及系统发育分析

DNA 提取:参照梁宗琦等^[9]的方法进行。取全部标本一小段无杂物的孢梗束,用液氮进行研磨后,按照 DNA 提取试剂盒(OMEGA HP Fungal DNA Kit)流程进行 DNA 提取。PCR 扩增 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 片段,引物为 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3'; ITS5: 5'-GGTGAGAGATTT CTGTTGC-3' (TIANGEN 生化科技北京有限公司)。反应体系(25 μ L): ddH₂O 8.5 μ L,模板 2 μ L,引物 ITS4 和 ITS5 (浓度均为 10 μ mol/L)均为 1 μ L, Master mix 为 12.5 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。分别取扩增后 PCR 产物和对照 5 μ L 置于 Parafilm 膜上与 5 μ L 的上样缓冲液(6 \times Loading buffer)混匀,点样于加 0.8% GelRed 的琼脂糖凝胶中电泳,40 min 后检测扩增产物。

PCR 产物纯化和 DNA 测序:样品经纯化和测序(北京,天根生化科技有限公司),获得的序列经

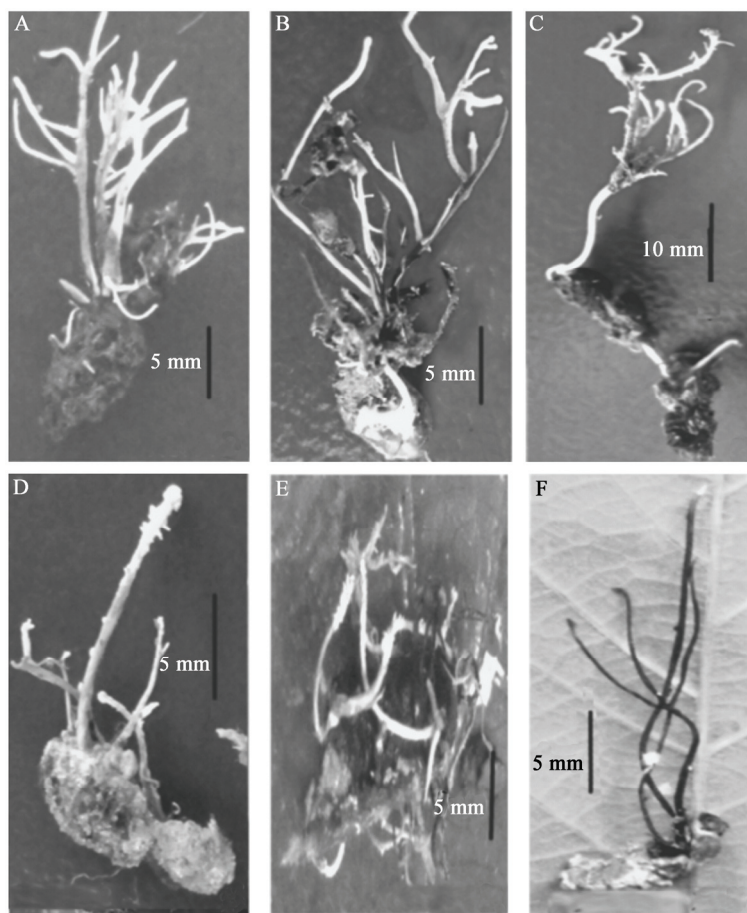


图 1 小车河湿地公园一个猛蚁蚁巢中的束梗孢类昆虫病原真菌

Figure 1 Several stilbellaceous entomogenous fungi in an ant nest of *Ponera* Latreille at the Xiaochuhe Wetland Park, Guiyang City

Note: A: XCH-ant-706; B: XCH-ant-8; C: XCH-ant-L3; D: XCH-ant-722; E: GZAC XCH-ant-710; F: XCH-ant-03.

手工校对后, 于 GenBank 进行比对和注册序列号。

序列比对和系统发育分析: 供试标本序列, 于 GenBank 中进行 BLAST 比对, 然后下载相似性大于 70%–95% 的近缘属菌株的 ITS1-5.8S-ITS2 序列, 以及其他形态相近真菌的序列, 全部下载序列经 ClustalX 1.83 软件比对及手工校正后, 以围小丛壳 *Glomerella cingulata* Spauld. & H. Schrenk 为外群, 用 MEGA 5.05 软件的最大似然法(ML)构建系统发育树^[10]。系统发育网络采用 SplitsTree 4 软件 Neighbor-Net 方法构建^[11], 运行条件为默认设置。

2 结果与讨论

2.1 种的鉴定与描述

蚁生多头束霉 新种 图 2

Tilachlidium poneraticum Z.Q Liang, J.D Liang, W.H. Chen & Y.F. Han sp. nov. Figure 2

Mycobank No.: MB 812562; Fungal Name No.: FN570176; GenBank No.: KP890686

The host about 0.9 cm long, 0.3 cm wide. Synnemata about 0.9–1.2 cm long, 120–270 μm wide, emerging from multiple sites on host, branched, short. Phialides scattered, usually terminating hyphae of the synnema, or as lateral cells of the hyphae, cylindrical, gradually narrowing to acuminate apices, (11.9–16.2) μm \times 1.1 μm . Conidia smooth, hyaline, single, with thin mucus, cylindrical or ellipsoidal, (2.2–4.3) μm \times 1.1 μm .

Type specimen: Holotype XCH-ant-710, on which Figure 1 was based on 15 June 2013, collected on a soldier ant in a *Ponera* sp. Nest, by J.D. Liang and W.H. Chen (GZAC XCH-ant-710, GenBank

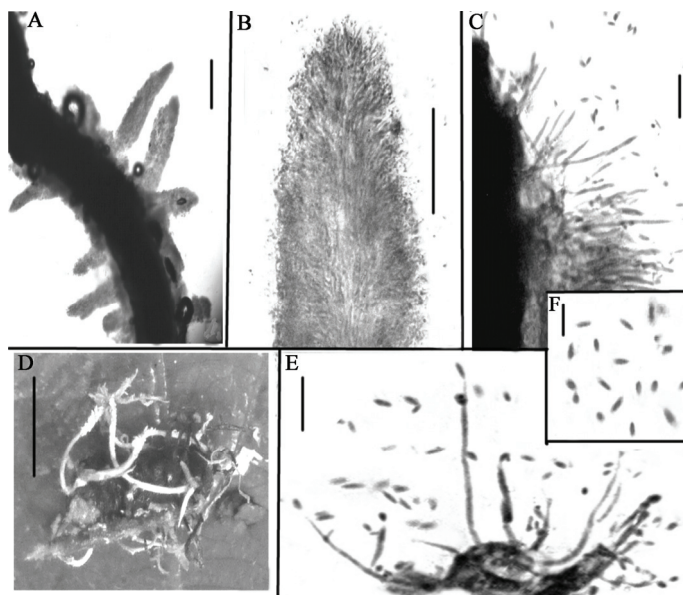


图2 蚁生多头束霉(GZAC XCH-ant-710)及其产孢结构

Figure 2 *Tilachlidium poneraticum* Z.Q Liang, J.D Liang, W.H. Chen & Y.F. Han (GZAC XCH-ant-710) and its conidiogenous structures

注: A-C: 放大的孢梗束上部; D: 虫体上生长的孢梗束; E: 放大的产孢细胞; F: 分生孢子。

Note: A-C: The upper part of a synnematum; D: Synnemata on an ant; E: Magnified conidiogenous cells; F: Conidia. Bars: A=200 μm ; B=100 μm ; D=0.5 cm; C, E, F=10 μm .

KP890686), in Xiaochehe Wetland Park, Guiyang City, Guizhou Province, China. The specimen was deposit in the Institute of Fungal Resource, Guizhou University (originating from the Herbarium of Guizhou Agricultural College, GZAC).

Etymology: Referring to the genus of the host organism, *Ponera* sp..

Teleomorph: Not known.

Host: A soldier ant of *Ponera* sp..

Locality: Xiaochehe Wetland Park, Guiyang City, Guizhou Province, China.

蚂蚁寄主长 0.9 cm, 宽 0.3 cm; 孢梗束长约 0.9–1.2 cm, 宽 120–270 μm , 从寄主各处长出, 孢梗束上具分枝, 短; 瓶梗直接着生在孢梗束的外围菌丝或短的分生孢子梗上, 柱状, 向上逐渐变细, (11.9–16.2) μm ×1.1 μm 。分生孢子表面光滑, 透明, 单生, 具薄的粘液, 呈柱状或椭圆形, (2.2–4.3) μm ×1.1 μm 。

模式标本: GZAC XCH-ant-710, 采自中国, 贵州省, 贵阳市, 小车河湿地公园。一种猛蚁(*Ponera* sp.)蚁巢的兵蚁。梁建东和陈万浩等, 2013 年 6 月

15 日采集。标本现保存于贵州大学真菌资源研究所(原贵州农学院真菌资源标本馆 GZAC)。

词源学: *Poneraticum*, 指模式寄主蚂蚁的属名(*Ponera*)。

寄主: 一种猛蚁(*Ponera* sp.)的兵蚁。

有性型: 不详。

采集地: 贵州省, 贵阳市, 小车河湿地公园。

在表型特征上, 多头束霉属 *Tilachlidium* 以其孢梗束柱状、分枝、并向上变尖而不形成膨大的孢子团(Clump)区别于多头霉属^[6]。本文报道的新种蚁生多头束霉与此属中的一些寄生于鳞翅目昆虫和叶蝉的种相近(表 1), 但本种能以寄主为蚂蚁、较小的瓶梗 (11.9–16.2) μm ×1.1 μm , 及分生孢子 (2.2–4.3) μm ×1.1 μm 与它们相区别。

2.2 分子系统发育分析

基于 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 序列构建的 ML 树, 获得了高支持率的 4 个进化分支(图 3)。标本 XCH-ant-L3、XCH-ant-8、XCH-ant-722、以及标本

表 1 几种虫生多头束霉的形态特征比较
Table 1 A comparison of morphological characters of several entomopathogenic *Tilachlidium* species

菌名 Names	寄主昆虫 Hosts	瓶梗 Phialides (μm)	分生孢子 Conidia (μm)
<i>T. larvarum</i>	A lepidopterous larva	Conical or flask-shaped (14–22)×2	Narrow-oval (4–6)×(2–2.5)
<i>T. ramosum</i>	A lepidopterous larva	Subulate (19.3–36.4)×(2.1–3.2)	Oblong (3.2–5.5)×(1–1.4)
<i>T. brachiatum</i>	A leaf hopper		Narrow-oval (2–4)×(0.75–1)
<i>T. pinnatum</i>	Lepidopterous larva and adults	Subulate (27–61)×(2.5–3)	Ellipsoidal (4.2–7)×(1.5–2.5)
<i>T. poneraticum</i>	Ant	Cylindric (11.9–16.2)×1.1	Cylindric or ellipsoidal (2.2–4.3)×1.1

XCH-ant-706 的孢梗束头部(XCH-ant-706T)、柄部(XCH-ant-706M)和内菌核(XCH-ant-706S)的序列均与多头霉属的一些种聚在线虫草菌科(Ophiocordycipitaceae)进化分支中。除标本 XCH-ant-722 是猛蚁多头霉 *Polycephalomyces ponerus* Z.Q. Liang, W.H. Chen, J.D. Liang, Y.F. Han & X. Zou 外, 其余标本为枝多头霉 *Polycephalomyces ramosus* (Peck) Mains, 它们均非重寄生、附生或混合感染的真菌^[9]。标本 XCH-ant-03 则和几个已知层束梗孢属成员聚在线虫草菌科的另一个进化分支中, 并与球头虫草 *Cordyceps sphecocephala* (Kl.) Coole 聚为一支, 支持值为 78%, 球头虫草的无性型是一种层束梗孢, XCH-ant-03 的系统发育地位有待进一步研究。一些在宏观特征上与本研究的标本类似的刺束梗孢 *Akanthomyces* spp. 在树中构成了虫草科(Cordycipitaceae)进化分支。此外, 包含了几株黄绿绿僵菌 *Metarhizium flavoviride* W. Gams & Rozsypal 的序列构成了麦角菌科(Clavicipitaceae)进化分支。本文研究的标本 GZAC XCH-ant-710, 在系统树中独立形成一支, 介于麦角菌科和两个虫草菌科的进化分支之间。此系统发育树未能解析标本 GZAC XCH-ant-710 的确切分类地位。

3 讨论

真菌种的传统概念是形态学种, 主要的识别方

法是表型特征识别。目前, 除极少数种外, 大约 7 万种都是用形态学特征, 或其他表型特征(如在不同温度或水分活度下的生长、次生代谢产物或色素的形成)进行鉴定识别的。这种鉴定方法的最大优势是, 它能在现存分类单元间, 以及与新分类单元间进行比较^[12]。近年的研究发现, 一个基于形态学鉴定识别的种, 当用分子系统学方法进行研究时, 常出现不一致性。组合形态学和分子系统学等的多途径分析研究得到了真菌学家的普遍应用。遗憾的是, 多头束霉属 *Tilachlidium* 在 GenBank 或其他数据库中, 皆未能发现它们的 rDNA 分子数据, 故在我们构建的系统发育树(图 3)中, 难以对研究的标本 GZAC XCH-ant-710 提供明确的分类地位解析。在拆分网络(图 4)中, 则显示了它与宏观特征相近的多头霉属成员也有较大的矛盾冲突; 与黄绿绿僵菌及刺束梗孢属 *Akanthomyces* 的成员也仅有一定的相关性。在本研究中, 基于经典的形态学特征鉴定就具有明显的合理性及实用价值。

真菌-寄主的关联模型可概括为两类, 一类是共进化模型, 而更多的是寄主跃迁。寄主跃迁与它们共同生于同一环境密切相关^[13]。在生存环境中, 营养来源是一个十分重要的影响因素。昆虫与真菌的营养关系在长期的进化中已形成了活体营养(Biotrophy)、死体营养(Necrotrophy)和半活体营养(Hemibiotrophy)多种类型。肉座菌目真菌的营养模

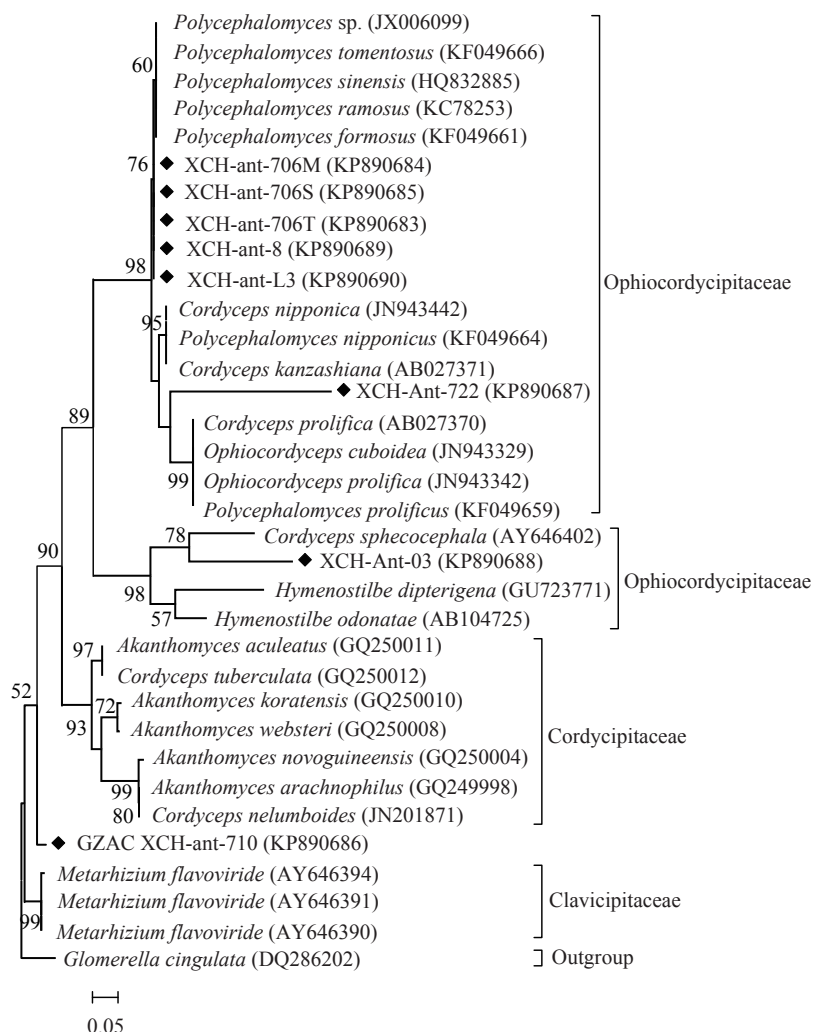


图3 基于 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 序列构建的 ML 树(MEGA 5.05)

Figure 3 A phylogeny ML tree built by MEGA 5.05 based on rDNA ITS1-5.8S-ITS2 sequences

式是从植物(包括活体及植物残体)—动物(特别是昆虫)—真菌。肉座菌科/麦角菌科真菌共同祖先的早先营养来源是植物及其残体。随后,它们的进化使它们离弃了植物营养而跃迁到了特定的动物和真菌营养^[14]。现在,它们的寄主已包括线虫、轮虫、软体动物和至少 10 个目的节肢动物(特别是昆虫)。能寄生的真菌也极具多样性,包括锈菌(Urediniomycetes)、伞菌类(Hymenomycetes)和大团囊菌(Elaphomyces)。基于系统发育谱系中与营养偏好的相关性能预测某一成员的特性和演化位置^[13-14]。寄主昆虫的种类在昆虫病原真菌物种的界定上是

重要的鉴别特征之一^[15]。

在真菌-节肢动物进化关系中存在大量共生进化现象及真菌生活史中多部分的趋同进化。在昆虫病原真菌中,除有性型结构特征的趋同现象外,它们无性型的产孢结构也存在趋同现象^[16]。在我们的研究中已发现,标本 GZAC XCH-ant-710 的孢梗束形态特征与多头霉属的一些成员很相似,具有趋同进化现象^[9]。这种产孢结构的趋同性,与它们共处同一蚁巢生境,并适应它们的分生孢子被蚂蚁携带和扩散的密切关系。蚂蚁在复杂多样的森林生态中活动范围广,能接触到丰富多样的昆虫病原真菌。

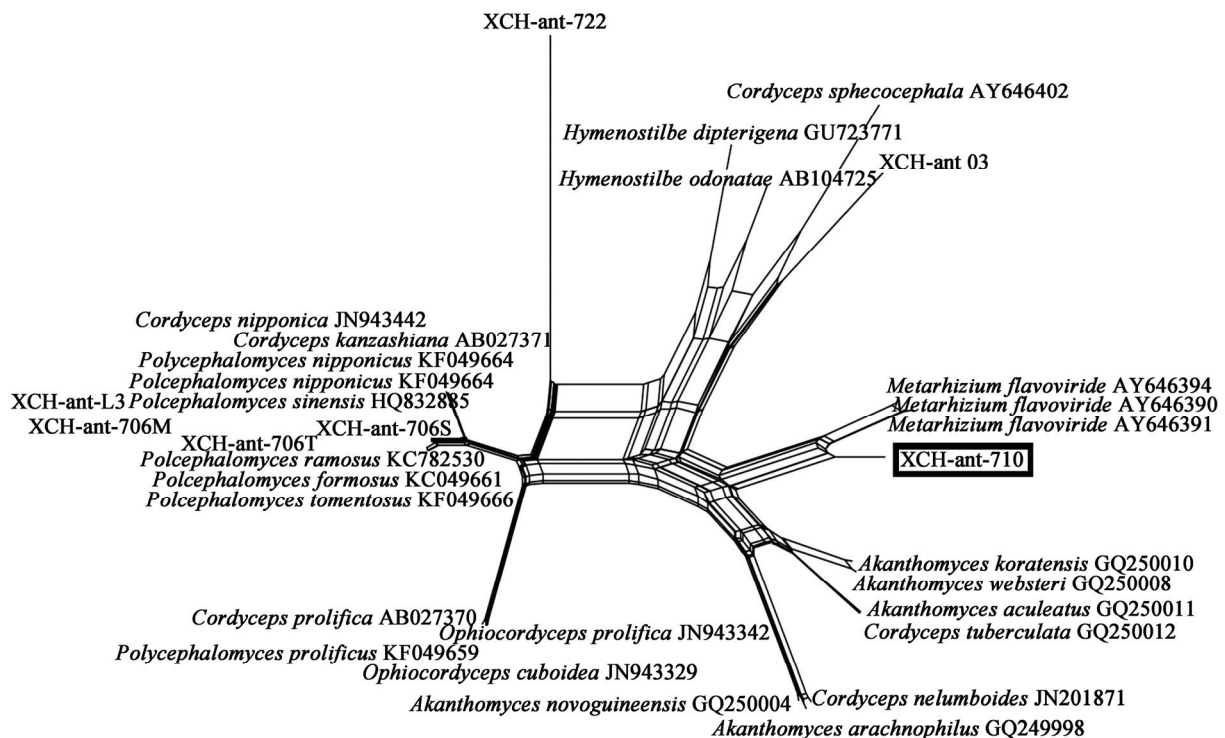


图 4 基于图 3 系统树数据集构建的邻接网络图
Figure 4 Neighbor-net graph of the data used in Figure 3

这样, 同一蚁巢中就出现了产孢结构趋同而物种多样的有趣现象。

参考文献

- [1] Liang JD, Chen WH, Han YF, et al. *Tilachlidiopsis scarabaei* L.S. Olive, a rare stilbellaceous entomogenous fungus in China[J]. Microbiology China, 2014, 41(6): 1121-1124 (in Chinese)
梁建东, 陈万浩, 韩燕峰, 等. 金龟拟多头束霉 *Tilachlidiopsis scarabaei*, 一种稀有的束梗孢类昆虫病原真菌[J]. 微生物学通报, 2014, 41(6): 1121-1124
- [2] Feng YJ, Blunt JW, Cole ALJ, et al. Novel cytotoxic thiodiketopiperazine derivatives from a *Tilachlidium* sp.[J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(12): 2090-2092
- [3] Han XX, Wang XL, Huang XR. Identification of toxin component in the products of fungus YMF-7 isolated from moldy corn[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(31): 13496-13497 (in Chinese)
韩小贤, 王显伦, 黄晓睿. 霉变玉米分离真菌 YMF-7产物中毒素成分的识别[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13496-13497
- [4] Preuss CGT. Übersicht untersuchter Pilze, besonders aus der Umgegend von Hoyerswerda[J]. Linnaea, 1851, 24: 99-153
- [5] Seifert KA, Samuels GJ. How should we look at anamorphs?[J]. Studies in Mycology, 2000, 45: 5-18
- [6] Mains EB. Entomogenous species of *Hirsutella*, *Tilachlidium* and *Synnematium*[J]. Mycologia, 1951, 43(6): 691-718
- [7] Petch T. Notes on entomogenous fungi[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1931, 16(1): 55-75
- [8] Mains EB. New species of *Torrubiella*, *Hirsutella* and *Gibellula*[J]. Mycologia, 1949, 41(3): 303-310
- [9] Liang ZQ, Chen WH, Liang JD, et al. Phenotypic polymorphism of the stilbellaceous entomogenous fungi in an ant nest of *Ponera*[J]. Mycosystema, 2016. DOI: 10.13346/j.mycosystema.150069 (in Chinese)
梁宗琦, 陈万浩, 梁建东, 等. 一个蚁巢中束梗孢类昆虫病原真菌的多型现象 I[J]. 菌物学报, 2016. DOI: 10.13346/j.mycosystema.150069
- [10] Tamura K, Peterson D, Peterson K, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [11] Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies[J]. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23(2): 254-267
- [12] Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 2000, 31(1): 21-32
- [13] Vega FE, Goettel MS, Blakwell M, et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology[J]. Fungal Ecology, 2009, 2(4): 149-159
- [14] Spatafora JW, Sung GH, Sung JM, et al. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes[J]. Molecular Ecology, 2007, 16(8): 1701-1711
- [15] Nikoh N, Fukatsu T. Interkingdom host jumping underground: phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(4): 629-638
- [16] Blackwell M. Fungal evolution and taxonomy[J]. BioControl, 2010, 55(1): 7-16