



研究报告

几株类棒束孢菌株分类地位的修订

林伊¹ 刘玉军² 汪婷¹ 陈名君^{*1}

1 安徽农业大学 安徽省微生物防治重点实验室 安徽 合肥 230036

2 安徽省科学技术研究院 安徽 合肥 230031

摘要: 【背景】粉棒束孢是自然环境中常见的一种昆虫病原真菌，全球广泛分布且寄主多样。然而，棒束孢属许多种形态学特征相似，仅根据经典形态学鉴定容易出现错乱现象。长期以来依据形态特征鉴定为粉棒束孢的菌株，其准确的分类地位出现了越来越多的争议。最近，该属起源被确定是多系发生的。【目的】明确粉棒束孢的分类沿革并探究先前被鉴定为粉棒束孢菌株的准确分类地位。

【方法】选取 6 株先前被鉴定为粉棒束孢的菌株，对其进行经典形态观察，并扩增 5 个基因位点(nrSSU、nrLSU、TEF、RPB1 和 RPB2)的基因序列，进行多基因分子系统发育学分析。【结果】通过查阅文献和实验研究，明确了粉棒束孢分类研究的历史沿革；供试的 6 株不同来源的菌株与粉棒束孢模式种亲缘关系较远，而与新成立的组合种 *Samsoniella hepiali* 完全一致。【结论】利用经典形态学特征和构建 5 个基因系统发育树，重新修订 6 株类棒束孢菌株的正确分类地位为 *Samsoniella hepiali*。为该类昆虫病原真菌正确分类提供合理的方法，也为开发和利用该类菌株提供科学的指导。

关键词：粉棒束孢，系统发育学，分类地位

Revision of taxonomic status of several *Isaria*-like strainsLIN Yan¹ LIU Yujun² WANG Ting¹ CHEN Mingjun^{*1}

1 Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

2 Anhui Academy of Science and Technology, Hefei, Anhui 230031, China

Abstract: [Background] *Isaria farinosa* with global distribution and wide host range is one of common entomopathogenic fungi in natural environment. However, the morphological characteristics of many species of *Isaria* are similar, which are easy to be confused only according to the classical morphological identifications. For a long time, more and more controversies and confusions have emerged on the accurate classification status of the strains identified as *I. farinosa* according to their morphological characteristics. Recently, its phylogeny has proved multigenus. [Objective] To clarify the taxonomic position of *I. farinosa* and explore the natural taxonomic status of the strains which were previously identified as *I. farinosa*. [Methods] Six strains previously identified as *I. farinosa* were selected for phylogenetic analysis

Foundation items: Support Plan for Excellent Young Talents in Colleges and Universities of Anhui Province (gxyqZD2019013); Postgraduate Innovation Fund Project of Anhui Agricultural University (2020ysj-21); Project of Science and Technology Department of Anhui Province (1906b050305)

*Corresponding author: E-mail: mjchen@ahau.edu.cn

Received: 05-03-2021; Accepted: 20-04-2021; Published online: 29-04-2021

基金项目：安徽省高校优秀青年人才支持计划项目(gxyqZD2019013)；安徽农业大学研究生创新基金项目(2020ysj-21)；安徽省科技厅项目(1906b050305)

*通信作者：E-mail: mjchen@ahau.edu.cn

收稿日期：2021-03-05；接受日期：2021-04-20；网络首发日期：2021-04-29

of five gene loci (nrSSU, nrLSU, TEF, RPB1 and RPB2) and morphological methods to reconfirmed their taxonomic status. **[Results]** Through checking on the literature and experimental research, the phylogeny of *I. farinosa* was clarified. The results showed that all the tested strains from different sources were far related to the model strain of *I. farinosa*, but they are identical to a new combination species *Samsoniella hepiali*. **[Conclusion]** In this study, the correct taxonomic status of 6 *Isaria*-like strains was revised as *S. hepiali* by using the classical morphological characteristics and constructing the five genes phylogenetic tree. To provides a reasonable method for the correct identification of *Isaria*-like fungi and scientific guidance for further utilization of these strains.

Keywords: *Isaria farinosa*, phylogenetics, taxonomic status

粉棒束孢(*Isaria farinosa*) (Holmsk.) Fr. 1832 属于肉座菌目(*Hypocreales*)虫草科(*Cordycipitaceae*)棒束孢属(*Isaria*) [(已组合至虫草属 *Cordyceps*)]。其形态学特点是分生孢子梗密集分枝,在其上以轮生的形式产生瓶梗,瓶梗通常基部膨大并且向上逐渐形成一个细颈,分生孢子具发散链。该菌广泛分布在温带和热带区域且宿主昆虫相当广泛,是生物防治的理想菌株,在生物防治上具有重要的意义^[1]。然而,由于棒束孢属历史悠久且历经多次调整,在使用该名称的时候产生了很多混乱。该属最早由 Pers. 1794 建立,随后 Samson^[2]将包括粉棒束孢在内的多个种移入拟青霉属(*Paecilomyces* Bainier)。后来, Hodge 等^[3]经过考证重新确立 *I. farinosa* 的模式菌株,因此又提出让其回归棒束孢属。近年来,根据 Kepler 等^[4]的建议,又将棒束孢属部分种组合到虫草属。

之前关于真菌的界定多依据传统的形态描述,但随着分子系统发育的研究,原先被移入拟青霉属的昆虫病原真菌又被陆续重新调整回去,特别是基于多基因位点的序列比较越来越成为研究真菌系统发育关系和疑难种分类地位的有力武器。Sung 等^[5]率先采用多基因系统发育分析将原先的麦角菌科(*Clavicipitaceae*)重新划分为 3 个科,分别是麦角菌科、虫草科和线虫草科(*Ophiocordycipitaceae*);同时他们的研究表明,棒束孢属物种在虫草科内是多系发生的,即棒束孢属在虫草科中并不能独立聚成一个单支。该结果支持了 Luangsa-Ard 等^[6]的推论,即用一般的形态(如瓶梗和分生孢子的形状)

特征来区分棒束孢属内的物种并不可靠。随后, Kepler 等^[4]对虫草科的物种进行分类总结,发现粉棒束孢的模式种 CBS 111113 位于虫草属(*Cordyceps*) Fr.的分支上;鉴于“一菌一名”(One Fungus One Name)原则,他建议将原先的 *I. farinosa* 更名为 *C. farinosa* (Holmsk.) Kepler, B. Shrestha & Spatafora。Mongkolsamrit 等^[7]则研究证明来自泰国的部分类棒束孢菌株(即形态上为类似棒束孢的真菌)在虫草科内聚成单系进化支并且与刺束梗孢属(*Akanthomyces*) Lebert 亲缘关系相近,因此成立新属 *Samsoniella* Mongkols., Noisrip., Thanakitp., Spatafora & Luangsa-ard, 将这些类棒束孢菌株囊括进去。Wang 等^[8]对云南地区的类棒束孢的菌株进行梳理,发现这些菌株在系统发育上全部被归入新成立的 *Samsoniella* 属;尤其是曾被视作冬虫夏草无性型之一的蝙蝠蛾拟青霉(*P. hepiali*)被重新组合命名为 *Samsoniella hepiali* (Q.T. Chen & R.Q. Dai ex R.Q. Dai, X.M. Li, A.J. Shao, Shu F. Lin, J.L. Lan, Wei H. Chen & C.Y. Shen) H. Yu, R.Q. Dai, Y.B. Wang, Y. Wang & Zhu L. Yang。

随着分类学研究的发展,原有的类棒束孢真菌在分类领域已经引起一些错乱现象,因此有必要重新审视原先在国内被鉴定为粉棒束孢的菌株。本研究选取 6 株从安徽采集的不同寄主上的鉴定为粉棒束孢菌株,对其核糖体大小亚基(nrSSU 和 nrLSU)、转录延长因子(TEF)、RNA 聚合酶 II 第一和第二亚基(RPB1 和 RPB2) 5 个基因位点进行测序,用于构建系统发育树并结合经典形态学手段对其进行重新鉴定,以确认其分类地位,以期为该菌开发利用

提供准确鉴定和科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

6 个供试菌株来源于安徽农业大学安徽省微生物防治重点实验室, 经分离和形态特征鉴定, 6 个菌株初步鉴定为粉棒束孢。菌株的寄主和来源信息见表 1。

1.2 主要试剂和仪器

2×Taq Plus MasterMix, 北京康为世纪生物科技有限公司; 本实验所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 凝胶纯化回收试剂盒, Omega Bio-Tek 公司。PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司; 超净工作台, 上海博讯实业有限公司; 智能光照培养箱, 上海三发科学仪器有限公司。

1.3 供试菌株的形态观察

根据文献[7]将菌株制成 1×10^6 个孢子/mL 悬浮液, 取 1.5 μ L 接种于马铃薯葡萄糖琼脂(Potato Dextrose Agar, PDA)和麦芽提取物琼脂(Malt Extract Agar, MEA)培养基中心, 并置于 25 $^{\circ}$ C 左右(L:D=12:12)培养箱培养 14 d, 观察菌落变化, 量取菌落直径。将真菌组织如产孢结构、分生孢子、菌丝等从基质中取出固定于载玻片, 用乳酸棉蓝溶液染色并置于光学显微镜下观察拍照。对需要量取的数值, 如孢子大小、产孢瓶梗长短等, 各取 20–30 个

测量。取值范围由平均值 \pm 标准差计算得到, 括号内为绝对最小值和最大值。

1.4 DNA 提取、PCR 扩增与测序

菌株接种于铺有灭菌玻璃纸的 SDAY 培养基上, 25 $^{\circ}$ C 左右(L:D=12:12)培养 3–5 d。取新鲜菌丝, 采用改良的 CTAB 法^[9]抽提基因组 DNA。用于扩增的 5 基因位点和引物: nrSSU 使用 NS1 和 NS4 引物对^[10]; nrLSU 使用 LROR 和 LR5^[11]; TEF 使用 983F 和 2218R^[12]; RPB1 采用 CRPB1 和 RPB1Cr^[13]; RPB2 采用 fRPB2-5F 和 fRPB2-7cR^[14]。以上引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系(25 μ L): 2×Taq Plus MasterMix 12.5 μ L, 引物(0.01 mol/L)各 1 μ L, 模板 DNA (1–2 ng) 1.5 μ L, 超纯净水 9 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, TM 值减去 3–4 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 染色后使用凝胶成像系统检测。使用凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物, 方法按 Omega Bio-Tek 公司提供的操作步骤进行。将切胶纯化后的样品连同使用的引物送往华大基因(北京)公司进行测序。

1.5 序列比对与系统发育分析

使用 Chromas 检查初始序列峰图并选取准确、无重峰、无杂合的序列, 再对正反序列使用 DNAMAN 进行拼接。将拼接好的序列导入 BioEdit V7.0.9 检查是否存在歧义碱基, 然后提交给 GenBank 取得登录号(表 2)。表 2 中的其他相关序列均来自 GenBank 数据库。利用 MAFFT V7.3.13^[15] 进行多序列比对, 将比对调整后的 5 个基因数据矩阵序列拼接合并为 1 个数据集。以淡紫紫孢霉(*Purpureocillium lilacinum*) (Thom.) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson 为外类群构建系统发育树。根据赤池信息量准则(Akaike Information Criterion, AIC), 利用 MrModeltest2.3 为最大似然法(Maximum Likelihood, ML)分析和贝叶斯(Bayesian Inference, BI)分析筛选最佳的模型。ML 分析和 BI 分析分别采用 RAxML V8.2.10^[16]和 MrBayes 3^[17]。构建的发育树使用 MEGA 6^[18]进行修饰。

表 1 供试菌株寄主及来源

Table 1 Insect hosts and locality origins of 6 tested isolates

| 菌株编号 | 寄主 | 采集地 |
|------------|-------------------------------|---------------------|
| Strain No. | Host | Locality |
| RCEF 0672 | 叶蝉 | 安徽天堂寨 |
| | <i>Hemiptera</i> : leafhopper | Tiantangzhai, Anhui |
| RCEF 0696 | 鳞翅目(幼虫) | 安徽天堂寨 |
| | <i>Lepidoptera</i> | Tiantangzhai, Anhui |
| RCEF 0881 | 蝉 | 安徽牯牛降 |
| | <i>Hemiptera</i> : cicada | Guniujiang, Anhui |
| RCEF 0883 | 蝉 | 安徽牯牛降 |
| | <i>Hemiptera</i> : cicada | Guniujiang, Anhui |
| RCEF 3666 | 蝉(若虫) | 安徽牯牛降 |
| | <i>Hemiptera</i> : cicada | Guniujiang, Anhui |
| RCEF 3890 | 蝉(若虫) | 安徽牯牛降 |
| | <i>Hemiptera</i> : cicada | Guniujiang, Anhui |

表 2 本研究中使用的标本及其基因库登录号列表

Table 2 List of specimens and the GenBank accession numbers used in this study

| 物种 Species | 菌株编号 Strain No. | 基因库登录号 GenBank accession No. | | | | |
|--|--------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | nrSSU | nrLSU | TEF | RPB1 | RPB2 |
| <i>Akanthomyces aculeatus</i> | HUA 186145 | MF416572 | MF416520 | MF416465 | — | — |
| <i>Akanthomyces attenuatus</i> | CBS 402.78 | AF339614 | AF339565 | EF468782 | EF468888 | EF468935 |
| <i>Akanthomyces coccidioperitheciata</i> | NHJ 6709 | EU369110 | EU369042 | EU369025 | EU369067 | EU369086 |
| <i>Akanthomyces farinosa</i> | CBS 541.81 | MF416606 | MF416553 | MF416498 | MF416655 | MF416449 |
| <i>Akanthomyces lecani</i> | CBS 101247 | AF339604 | AF339555 | DQ522359 | DQ522407 | DQ522466 |
| <i>Akanthomyces pistillariaeformis</i> | HUA 186131 | MF416573 | MF416521 | MF416466 | — | — |
| <i>Akanthomyces tuberculatus</i> | BCC 16819 | MF416600 | MF416546 | MF416490 | MF416647 | MF416444 |
| <i>Akanthomyces tuberculatus</i> | OSC 111002 | DQ522553 | DQ518767 | DQ522338 | DQ522384 | DQ522435 |
| <i>Ascopolyporus polychrous</i> | P.C. 546 | — | DQ118737 | DQ118745 | DQ127236 | — |
| <i>Ascopolyporus villosus</i> | ARSEF 6355 | — | AY886544 | DQ118750 | DQ127241 | — |
| <i>Beauveria bassiana</i> | ARSEF 1564T | — | — | HQ880974 | HQ880833 | HQ880905 |
| <i>Beauveria brongniartii</i> | ARSEF 617T | — | — | HQ880991 | HQ880854 | HQ880926 |
| <i>Beauveria brongniartii</i> | BCC 16585 | JF415951 | JF415967 | JF416009 | JN049885 | JF415991 |
| <i>Beauveria staphylinidicola</i> | ARSEF 5718 | EF468981 | EF468836 | EF468776 | EF468881 | — |
| <i>Blackwellomyces cardinalis</i> | OSC 93609 | AY184973 | AY184962 | DQ522325 | DQ522370 | DQ522422 |
| <i>Blackwellomyces pseudomilitaris</i> | NBRC 101409 | JN941748 | JN941393 | — | JN992482 | — |
| <i>Cordyceps cateniannulata</i> | CBS 152.83T | — | MG665226 | JQ425687 | — | — |
| <i>Cordyceps farinosa</i> | CBS 11113T | AY526474 | MF416554 | MF416499 | MF416656 | MF416450 |
| <i>Cordyceps fumosorosea</i> | CBS 107.10 | MF416608 | MF416556 | MF416502 | MF416659 | MF416453 |
| <i>Cordyceps fumosorosea</i> | CBS 244.31 | MF416609 | MF416557 | MF416503 | MF416660 | MF416454 |
| <i>Cordyceps kyusyuensis</i> | EFCC 5886 | EF468960 | EF468813 | EF468754 | EF468863 | EF468917 |
| <i>Cordyceps militaris</i> | OSC 93623 | AY184977 | AY184966 | DQ522332 | DQ522377 | AY545732 |
| <i>Cordyceps oncoperae</i> | AFSEF 4358 | AF339581 | AF339532 | EF468785 | EF468891 | EF468936 |
| <i>Cordyceps piperis</i> | CBS 116719 | — | AY466442 | DQ118749 | DQ127240 | EU369083 |
| <i>Cordyceps tenuipes</i> | ARSEF 5135T | — | JF415980 | JF416020 | JN049896 | JF416000 |
| <i>Cordyceps tenuipes</i> | OSC 111007 | DQ522559 | DQ518774 | DQ522349 | DQ522395 | DQ522449 |
| <i>Engyodontium aranearum</i> | CBS 309.85 | AF339576 | AF339526 | DQ522341 | DQ522387 | DQ522439 |
| <i>Gibellula longispora</i> | NHJ 12014 | EU369098 | — | EU369017 | EU369055 | EU369075 |
| <i>Gibellula pulchra</i> | NHJ 10808 | EU369099 | EU369035 | EU369018 | EU369056 | EU369076 |
| <i>Gibellula</i> sp. | NHJ 10788 | EU369101 | EU369036 | EU369019 | EU369058 | EU369078 |
| <i>Hevansia arachnophila</i> | NHJ 10469 | EU369090 | EU369031 | EU369008 | EU369047 | — |
| <i>Hevansia novoguineensis</i> | NHJ 13161 | EU369093 | — | EU369011 | EU369050 | — |
| <i>Hevansia novoguineensis</i> | NHJ 11923 | EU369095 | EU369032 | EU369013 | EU369052 | EU369072 |
| <i>Hyperdermium pulvinatum</i> | P.C. 602 | — | AF242353 | DQ118746 | DQ127237 | — |
| <i>Isaria farinosa</i> | OSC 111005 | DQ522558 | DQ518773 | DQ522348 | DQ522394 | — |
| <i>Isaria farinosa</i> | OSC 111006 | EF469127 | EF469080 | EF469065 | EF469094 | — |
| <i>Isaria farinosa</i> | RCEF 0883 | MW045180 | MW045186 | MW080837 | MW080843 | MW080849 |
| <i>Isaria farinosa</i> | RCEF 0881 | MW045181 | MW045187 | MW080838 | MW080844 | — |

(待续)

(续表 2)

| | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Isaria farinosa</i> | RCEF 3666 | MW045182 | MW045188 | MW080839 | MW080845 | MW080850 |
| <i>Isaria farinosa</i> | RCEF 3890 | MW045183 | MW045189 | MW080840 | MW080846 | MW080851 |
| <i>Isaria farinosa</i> | RCEF 0672 | MW045184 | MW045190 | MW080841 | MW080847 | – |
| <i>Isaria farinosa</i> | RCEF 0696 | MW045197 | MW045324 | MW080842 | MW080848 | MW080852 |
| <i>Lecanicillium antillanum</i> | CBS 350.85T | AF339585 | AF339536 | DQ522350 | DQ522396 | DQ522450 |
| <i>Lecanicillium aranearum</i> | CBS 726.73a | AF339586 | AF339537 | EF468781 | EF468887 | EF468934 |
| <i>Purpureocillium lilacinum</i> | CBS 284.36T | AY526475 | FR775484 | EF468792 | EF468898 | EF468941 |
| <i>Purpureocillium lilacinum</i> | CBS 431.87 | – | EF468844 | EF468791 | EF468897 | EF468940 |
| <i>Samsoniella alboaurantium</i> | CBS 240.32 | JF415958 | JF415979 | JF416019 | JN049895 | JF415999 |
| <i>Samsoniella alboaurantium</i> | CBS 262.58 | AB023943 | MG665232 | MF416497 | MF416654 | MF416448 |
| <i>Samsoniella alpina</i> | YFCC 5818T | MN576753 | MN576809 | MN576979 | MN576869 | MN576923 |
| <i>Samsoniella alpina</i> | YFCC 5831 | MN576754 | MN576810 | MN576980 | MN576870 | MN576924 |
| <i>Samsoniella antleroides</i> | YFCC 6016T | MN576747 | MN576803 | MN576973 | MN576863 | MN576917 |
| <i>Samsoniella antleroides</i> | YFCC 6113 | MN576748 | MN576804 | MN576974 | MN576864 | MN576918 |
| <i>Samsoniella aurantia</i> | TBRC 7271T | – | MF140728 | MF140846 | MF140791 | MF140818 |
| <i>Samsoniella aurantia</i> | TBRC 7272 | – | MF140727 | MF140845 | – | MF140817 |
| <i>Samsoniella cardinalis</i> | YFCC 5830 | MN576732 | MN576788 | MN576958 | MN576848 | MN576902 |
| <i>Samsoniella cardinalis</i> | YFCC 6144T | MN576730 | MN576786 | MN576956 | MN576846 | MN576900 |
| <i>Samsoniella cristata</i> | YFCC 6021T | MN576735 | MN576791 | MN576961 | MN576851 | MN576905 |
| <i>Samsoniella hepiali</i> | ICMM 82-2T | MN576738 | MN576794 | MN576964 | MN576854 | MN576908 |
| <i>Samsoniella inthanonensis</i> | TBRC 7915T | – | MF140725 | MF140849 | MF140790 | MF140815 |
| <i>Samsoniella kunmingensis</i> | YHH 16002 | MN576746 | MN576802 | MN576972 | MN576862 | MN576916 |
| <i>Samsoniella lanmaoa</i> | YFCC 6148T | MN576733 | MN576789 | MN576959 | MN576849 | MN576903 |
| <i>Samsoniella lanmaoa</i> | YFCC 6193 | MN576734 | MN576790 | MN576960 | MN576850 | MN576904 |
| <i>Samsoniella ramosa</i> | YFCC 6020T | MN576749 | MN576805 | MN576975 | MN576865 | MN576919 |
| <i>Samsoniella tortricidae</i> | YFCC 6131T | MN576750 | MN576806 | MN576976 | MN576866 | MN576920 |
| <i>Samsoniella yunnanensis</i> | YFCC 1527T | MN576756 | MN576812 | MN576982 | MN576872 | MN576926 |
| <i>Samsoniella yunnanensis</i> | YFCC 1824 | MN576757 | MN576813 | MN576983 | MN576873 | MN576927 |
| <i>Simplicillium lamellicola</i> | CBS 116.25T | AF339601 | AF339552 | DQ522356 | DQ522404 | DQ522462 |
| <i>Simplicillium lanosoniveum</i> | CBS 704.86 | AF339602 | AF339553 | DQ522358 | DQ522406 | DQ522464 |
| <i>Simplicillium obclavatum</i> | CBS 311.74T | AF339567 | AF339517 | EF468798 | – | – |
| <i>Torribiella wallacei</i> | CBS 101237T | AY184978 | AY184967 | EF469073 | EF469102 | EF469119 |

注: 加粗的登录号为本实验上传的序列; 带 T 字的菌株号为模式种; –: 基因序列未成功扩增

Note: The accession numbers in bold font refer to sequences generated in this study; Strain numbers with T are ex-type species; –: The gene sequence was not successfully amplified

2 结果与分析

2.1 供试菌株形态学特征

本研究选取 RCEF0696 菌株进行形态学观察, 所观察的菌落均由分生孢子萌发形成。25 °C 条件下, 在 PDA 培养基上菌落快速生长, 14 d 菌落直径可达 36–37 mm。菌落呈绒毛状且致密, 初白色, 产孢后微发黄, 在接种处周围形成同心圆(图 1A)。菌落边缘规则, 背部呈橘黄色(图 1B)。菌

丝壁光滑, 有分枝, 有隔膜且透明, 宽 1.4–2.5 μm。产孢结构(图 1C、1D)由直立的分生孢子梗组成, 通常从气生菌丝中产生, 每轮有 2–4 个瓶梗组成。瓶梗[2.9–4.7(–7.0)] μm×(1.0–1.5) μm, 具有圆柱形的基底, 向上逐渐变细形成一个细长的颈部, (1.0–2.0) μm×(0.5–1.0) μm。分生孢子(图 1E)常聚为长链, 透明, 大多纺锤形(两端尖), 少见椭圆形, 单细胞, (1.5–2.6)×[1.0–1.5(–2.0)] μm。

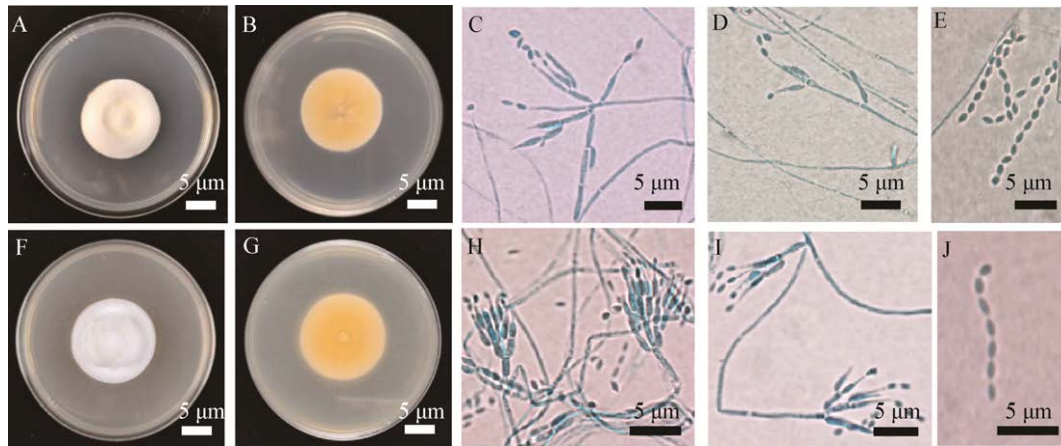


图 1 RCEF0696 菌株在 PDA 和 MEA 上的形态学特征

Figure 1 Morphological characteristics of strain RCEF0696 on PDA and MEA

注: A-B: PDA 上培养 14 d 的菌落正面和背面; C-E: PDA 上培养得到的瓶梗和孢子; F-G: MEA 上培养 14 d 的菌落正面和背面; H-J: MEA 上培养得到的瓶梗和孢子。标尺: A-B, F-G=15 mm; C-E, H-J=5 μm

Note: A-B: Colony on PDA at 14 d. A: Obverse. B: Reverse; C-E: Phialides with conidia on PDA. F-G: Colony (obverse and reverse) on MEA at 14 d; H-J: Phialides with conidia on MEA. Bars: A-B, F-G=15 mm; C-E, H-J=5 μm

菌落绒毛状且致密, 白色, 中部隆起的气生菌丝向上生长直到皿盖(图 1F)。菌落边缘规则, 背部呈橘黄色(图 1G)。菌丝壁光滑, 有分枝, 有隔膜, 透明, 宽 1.5–2.1 μm。产孢结构(图 1H、1I)由直立的分生孢子梗组成, 一般从气生菌丝中产生, 每轮有 2–5 个的瓶梗组成。瓶梗[3.0–4.5(–5.0)] μm×(0.9–1.2) μm, 具有圆柱形基底, 向上逐渐变细形成一个细长的颈部, (1.0–2.0) μm×(0.5–1.0) μm。分生孢子(图 1J)多聚为长链, 透明, 纺锤形(两端尖), 单细胞, [1.4–2.5(–3.0)] μm×[0.8–1.5(–2.0)] μm。菌落在 MEA 培养基上生长速度较 PDA 培养基快, 25 °C 条件下 14 d 直径达到 39–41 mm。

从生物学特性研究可以看出, RCEF0696 菌株

在 PDA 和 MEA 培养基上生长情况类似。从表 3 得知, 之前被鉴定为 *I. farinosa* 的菌落形态和文献[8]中 *Samsoniella hepiali* 一致, 与 *S. aurantia* Mongkols., Noisrip., Thanakitp., Spatafora & Luangsa-ard、*S. inthanonensis* Mongkols., Noisrip., Thanakitp., Spatafora & Luangsa-Ard 的菌落形态相似, 菌落表面都呈白色, 孢子也多为纺锤形; 然而 *I. farinosa* 的瓶梗明显偏小, 孢子同 *S. aurantia* 的孢子大小接近但小于 *S. inthanonensis*。以上可以看出, 类棒束孢菌株的菌落形态差异并不明显, 产孢结构和孢子形状更是十分相近, 因而单从形态角度无法明确区分。因此, 需要分子系统发育学研究提供可靠结果。

表 3 研究菌株与 *Samsoniella* 属相近种在 MEA 培养基上的形态比较

Table 3 Morphological comparison on research strain and relative species of *Samsoniella* on MEA

| 种名 Species | 菌落形态 Colony morphology | 瓶梗大小 Phialide size (μm) | 瓶梗形状(基部) Phialide shape (basal portion) | 孢子大小 Conidial size (μm) | 孢子形状 Conidial shape |
|----------------------------------|--|------------------------------------|---|-------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Samsoniella aurantia</i> | 白色, 背面深黄色 White, dark yellow on reverse | [(6.0–)6.5–8.5 (–10)]×(2.0–3.0) | 圆柱形至椭圆形 Cylindrical to oval | [(2.5–)3.0–3.5(–4.0)]× (1.0–2.0) | 纺锤形 Spindle shaped |
| <i>Samsoniella inthanonensis</i> | 白色, 背面不着色 White, colorless on reverse | [(5.0–)7.0–11.0 (–12.0)]×(1–2) | 圆柱形 Cylindrical | [(2.0–)3.0(–3.5)]× (1.5–2.0) | 纺锤形 Spindle shaped |
| <i>Samsoniella hepiali</i> | 白色, 背面白色后橘黄色 White, white to orange on reverse | (4.0–7.6)×(1.4–2.2) | 圆柱形 Cylindrical | (1.8–3.3)×(1.4–2.2) | 纺锤形至椭圆形 Spindle shaped to oval |
| <i>Isaria farinosa</i> | 白色, 背面橘黄色 White, orange on reverse | [2.9–4.7(–7.0)]× (1.0–1.5) | 圆柱形 Cylindrical | [1.5–2.6(–3.0)]× [0.8–1.5(–2.0)] | 纺锤形 Spindle shaped |

2.2 多基因系统发育分析

本研究共搜集 70 株与粉棒束孢相关种的 5 个基因数据用来重建虫草科的系统发育树。组合的数据矩阵包括 305 条序列共计 4 406 个碱基对(bp), 分别包括 nrSSU 1 011 bp、nrLSU 847 bp、TEF 956 bp、RPB1 701 bp、RPB2 887 bp。基于 AIC 筛选出的最佳模型是 GTR+I+G, 该模型结合随机起始树, 运行 200 万个世代的 4 个马可夫链, 每 100 代取一次样, 贝叶斯运算最终的分列频率平均标准差为 0.002 710。ML 分析采用相同模型, 而且与 BI 的结果具有相同的拓扑结构。从构建的多基因系统发育树(图 2)可以看出, 包括 *Samsoniella* 在内所有虫草科的物种都明显与其他类群区分开来。*Samsoniella* 属与刺束梗孢属共同位于一个大分支, 但是 *Samsoniella* 属明显单独聚成一类, 而且两属支持率都稳定超过 98%。本实验的 6 个菌株聚集到 *Samsoniella* 属, 与 *S. hepiali* 模式菌株 ICM82-22 聚为一支, 最大似然自举检验值(Maximum Likelihood Bootstrap Values, BP)和贝叶斯后验概率值(Bayesian Posterior Probabilities, PP)支持率均为 100%。因此, 结合形态学研究结果, 原先被鉴定为 *I. farinosa* 的供试菌株应被重新修订为 *S. hepiali*。

3 讨论与结论

黄勃等^[19]针对当时鉴定为粉棒束孢种内的 ITS 序列进行研究, 发现韩国学者测定的粉棒束孢 ITS 序列应为细脚棒束孢(*I. tenuipes* Peck)序列, 同时提出粉棒束孢的有性型可能是一种虫草的假设。本研究也测定了 6 株类棒束孢菌株 ITS 序列, 均在 550 bp 左右, 其中有 4 株序列完全相同, 与另 2 株仅有 2 个碱基差异。通过比较, 与 *S. hepiali* 模式菌株 Cs-4 ITS 序列(登录号: EU328187)基本相同, 仅有 1 个碱基差异; 而与 *Cordyceps farinosa* 模式菌株 CBS 111113 ITS 序列(登录号: AY624181)差异较大, 有 32 个碱基差异。可见, ITS 序列可用作该类真菌区别于粉棒束孢模式种的快速诊断。代永东等^[20]在研究云南粉棒束孢和蝙蝠蛾拟青霉这 2 个居群遗传多样性时, 根据研究结果, 提出应将蝙蝠蛾拟青霉作

为粉棒束孢的异名处理。然而 Wang 等^[8]对云南地区的类棒束孢的菌株进行梳理时, 将蝙蝠蛾拟青霉 *P. hepiali* 重新组合到 *Samsoniella*, 命名为 *S. hepiali*。从昆虫病原真菌的分类历史来看, *Samsoniella* 是在利用分子生物学技术基础上, 从棒束孢属进一步分类细化而来的, 而原先的棒束孢属被降格为一个形态描述上的概念。依据 Wang 等^[8]的报道, 推测中国境内一部分原先鉴定为类棒束孢的菌株极有可能被重新分类到 *Samsoniella*。

本次实验的结果表明, 供试的 6 株原先鉴定为粉棒束孢的菌株在培养形态上和 *S. hepiali* 一致, 和 *Samsoniella* 内的其他种相似; 同时, 通过构建 5 个基因系统发育树, 发现这些菌株与 *S. hepiali* 并为一支, 都属于 *Samsoniella* 类群且具有很高的支持率; 但是与 *C. farinosa* 模式种差距显著。因此, 根据形态学和分子系统发育学研究结果, 供试菌株应被重新修订为 *S. hepiali*。目前 *Samsoniella* 共确定有 16 个种, 分别为 *S. aurantia*、*S. inthanonensis*、*S. alboaurantium* Mongkols., Noisrip., Thanakitp., Spatafora & Luangsa-ard、*S. cristata* H. Yu, Y.B. Wang, Y. Wang & Zhu L. Yang、*S. tortricidae* H. Yu, Y.B. Wang, Y. Wang & Zhu L. Yang、*S. antleroides* H. Yu, Y.B. Wang, Y. Wang & Zhu L. Yang、*S. kunmingensis* H. Yu, Y.B. Wang, Y. Wang & Zhu L. Yang、*S. ramosa* H. Yu, Y.B. Wang, Y. Wang & Zhu L. Yang、*S. lanmaoa* H. Yu, Y.B. Wang, Y. Wang & Zhu L. Yang、*S. alpina* H. Yu, Y.B. Wang, Y. Wang & Zhu L. Yang、*S. cardinalis* H. Yu, Y.B. Wang, Y. Wang & Zhu L. Yang、*S. hepiali*、*S. yunnanensis* H. Yu, Y.B. Wang, Y. Wang & Zhu L. Yang、*S. coleopterorum* W.H. Chen, Y.F. Han & Z.Q. Liang、*S. hymenopterorum* W.H. Chen, Y.F. Han & Z.Q. Liang、*S. lepidopterorum* W.H. Chen, Y.F. Han & Z.Q. Liang; 寄主昆虫包括鞘翅目(Coleoptera)、膜翅目(Hymenoptera)和鳞翅目(Lepidoptera)^[8,21]。本次研究将半翅目(Hemiptera)昆虫(蝉和叶蝉)纳入该属的寄主昆虫范围。目前划定的 *Samsoniella* 的寄主范围主要是昆虫和部分昆虫病原真菌。类棒束孢菌株有

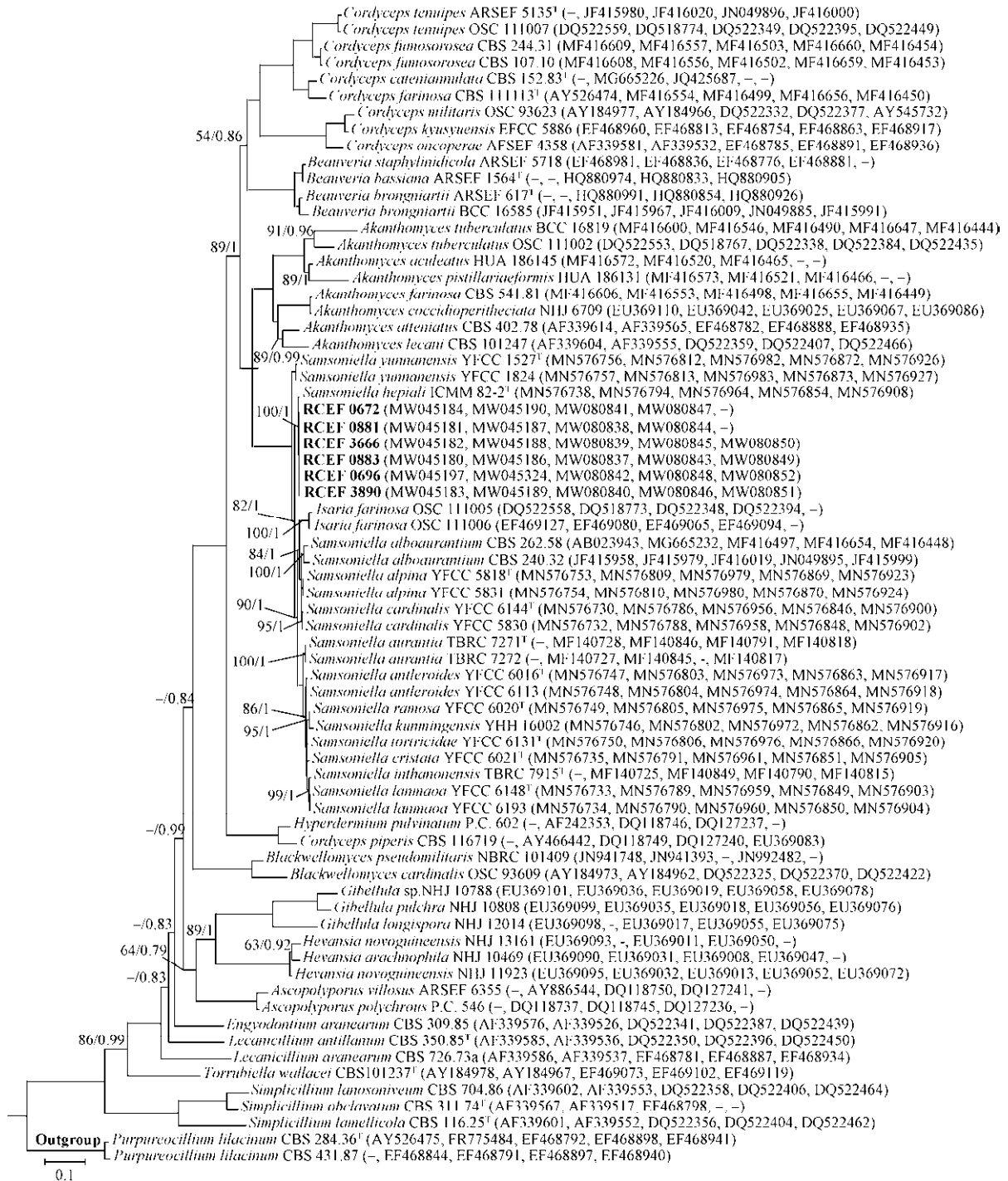


图 2 根据最大似然和贝叶斯分析基于 5 个基因构建出虫草科内相关种的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic reconstruction of *Samsoniella* and related species in the *Cordycipitaceae* obtained from 5 genes sequences based on Maximum Likelihood and Bayesian analysis

注: 树的分支上显示的是节点支持率, 反斜杠前是最大似然自举检验值(BP), 后是贝叶斯后验概率率值(PP); 节点处的支持率($\geq 50\%/0.5$)才会被显示, 粗线表示两项分析的支持率为 100% (或 1); 标尺表示进化距离; T: 模式种

Note: Numbers at the significant nodes represent Maximum likelihood bootstrap values (BP) and Bayesian posterior probabilities (PP); Statistical support values ($\geq 50\%/0.5$) are shown at the nodes, bold lines mean support of the tow analyses were 100% (or 1); Scale label presented distance scale; T: Refers to the ex-type species

着不同的起源背景, 比如, 原先鉴定为粉棒束孢真菌的寄主范围十分广泛, 除涵盖多种昆虫及蛛形目 (*Araneida*) 的蜘蛛外, 还有报道从各种生态系统土壤中分离得到^[22-23], 甚至可以从蛹虫草子座中分离获得^[24]。本实验仅研究了少数鉴定为粉棒束孢的菌株, 研究结果还不全面。今后将继续研究分离自不同采集地、不同寄主且鉴定为粉棒束孢的菌株, 重新修订该类昆虫病原真菌正确分类地位, 并为正确开发和利用该类菌株提供科学指导。

REFERENCES

- [1] Pu ZL, Li ZZ. Insect Mycology[M]. Hefei: Anhui Science and Technology Publishing House, 1996 (in Chinese)
蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥: 安徽科技出版社, 1996
- [2] Samson RA. *Paecilomyces* and some allied *Hyphomycetes*[J]. Studies in Mycology, 1974, 6: 1-119
- [3] Hodge KT, Gams W, Samson RA, Korf RP, Seifert KA. Lectotypification and status of *Isaria* pers.: Fr[J]. TAXON, 2005, 54(2): 485-489
- [4] Kepler RM, Luangsa-Ard JJ, Hywel-Jones NL, Quandt CA, Sung GH, Rehner SA, Aime MC, Henkel TW, Sanjuan T, Zare R, et al. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*)[J]. IMA Fungus, 2017, 8(2): 335-353
- [5] Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-Ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi[J]. Studies in Mycology, 2007, 57: 5-59
- [6] Luangsa-Ard JJ, Hywel-Jones NL, Manoch L, Samson RA. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species[J]. Mycological Research, 2005, 109(5): 581-589
- [7] Mongkolsamrit S, Noisripoom W, Thanakitpipattana D, Wutikhun T, Spatafora JW, Luangsa-Ard J. Disentangling cryptic species with *Isaria*-like morphs in *Cordycipitaceae*[J]. Mycologia, 2018, 110(1): 230-257
- [8] Wang YB, Wang Y, Fan Q, Duan DE, Zhang GD, Dai RQ, Dai YD, Zeng WB, Chen ZH, Li DD, et al. Multigene phylogeny of the family *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*): new taxa and the new systematic position of the Chinese cordycipitoid fungus *Paecilomyces hepiali*[J]. Fungal Diversity, 2020, 103(1): 1-46
- [9] Liu ZY, Liang ZQ, Whalley AJ, Yao YJ, Liu AY. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2001, 78(3): 178-182
- [10] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics[A]/PCR Protocols[M]. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322
- [11] Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(8): 4238-4246
- [12] Rehner SA, 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
- [13] Castlebury LA, Rossman AY, Sung GH, Hyten AS, Spatafora JW. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus[J]. Mycological Research, 2004, 108(8): 864-872
- [14] Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit[J]. Molecular Biology and Evolution, 1999, 16(12): 1799-1808
- [15] Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(4): 772-780
- [16] Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. Bioinformatics, 2014, 30(9): 1312-1313
- [17] Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572-1574
- [18] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729
- [19] Huang B, Wang CS, Wang B, Fan MZ, Li ZZ. nrDNA ITS analysis of *Paecilomyces farinosus* isolates[J]. Chinese Biodiversity, 2003, 11(6): 480-485 (in Chinese)
黄勃, 王成树, 王滨, 樊美珍, 李增智. 粉拟青霉种内 nrDNA ITS 分析[J]. 生物多样性, 2003, 11(6): 480-485
- [20] Dai YD, Yu H, Chen ZH, Yang JY. Genetic differentiation of an entomogenous fungus *Isaria farinosa* in Yunnan, China[J]. Mycosystema, 2015, 34(1): 38-52 (in Chinese)
代永东, 虞泓, 陈自宏, 杨俊媛. 云南虫生真菌粉棒束孢遗传分化研究[J]. 菌物学报, 2015, 34(1): 38-52
- [21] Chen WH, Han YF, Liang JD, Tian WY, Liang ZQ. Morphological and phylogenetic characterisations reveal three new species of *Samsoniella* (*Cordycipitaceae*, *Hypocreales*) from Guizhou, China[J]. MycoKeys, 2020, 74: 1-15
- [22] Lorch JM, Lindner DL, Gargas A, Muller LK, Minnis AM, Blehert DS. A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome[J]. Mycologia, 2013, 105(2): 237-252
- [23] Meyling NV, Schmidt NM, Eilenberg J. Occurrence and diversity of fungal entomopathogens in soils of low and high Arctic Greenland[J]. Polar Biology, 2012, 35(9): 1439-1445
- [24] Dai YD, Yu H, Yang K. Identifying a sporocarp-inhabiting fungus *Isaria farinosa* and analyzing its molecular phylogeny of ITS sequence[J]. Edible Fungi of China, 2013, 32(5): 46-52 (in Chinese)
代永东, 虞泓, 杨坤. 1 株重寄生真菌粉棒束孢鉴定及系统发育分析[J]. 中国食用菌, 2013, 32(5): 46-52