

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0121-123

冬虫夏草无性型的分子鉴别^{*}

赵 锦¹, 王 宁¹, 陈月琴¹, 李泰辉², 屈良鹄¹

(¹中山大学生物工程研究中心, 广州 510275; ²广东省微生物研究所)

摘 要: 采用分子生物学手段, 以 rDNA ITS 区为分子指标, 对冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* 的有性和无性阶段进行比较分析, 从分子水平证明冬虫夏草的无性阶段是中国被子毛孢 *Hirsutella sinensis*.

关键词: 冬虫夏草 *Cordyceps sinensis*, 无性型, rDNA ITS 区, 中国被子孢 *Hirsutella sinensis*

分类号: Q 949.32, Q 751 **文献标识码:** A

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 是一种虫生真菌 (简称虫草), 隶属于麦角菌目 Clavicipitales、麦角菌科 Clavicipitaceae 的虫草属 *Cordyceps*. 冬虫夏草 *C. sinensis* 有很高的药用价值, 长期以来便被视为珍贵的中药和藏药, 享誉全世界, 特别在东南亚地区有着广泛的影响. 人们在药店里常见到的是这种真菌的有性阶段成熟的子实体, 由真菌寄生 (后期腐生) 于鳞翅目蝙蝠蛾 *Hepialus* spp. 幼虫后所形成; 但迫于需求的压力和自然资源的衰竭, 目前也有不少代以冬虫夏草或其他虫草 *Cordyceps* spp. 的无性型 (无性阶段) 发酵菌丝体及其发酵产物生产的各种“虫草”成药或保健品. 可是人们对冬虫夏草的无性型种的鉴别仍存在着不同的观点. 如陈庆涛等^[1] 认为冬虫夏草的无性阶段可能是中国拟青霉 *Paecilomyces sinensis*; 李兆兰等^[2] 则认为有可能是中国弯颈霉 *Tolyposcladium sinense*; 而刘锡进等^[3] 则认为应该是中国被毛孢 *Hirsutella sinensis*. 其中以“中国拟青霉”一说流行较广, 因为不少人认为虫草属 *Cordyceps* 的无性型就是拟青霉属的无性型.

为了证明冬虫夏草的无性型的确切种类, 本文采用分子生物学手段, 以 rDNA 18S 和 25S 之间的转录间隔区 (ITS 区) 为分子指标, 通过对冬虫夏草及相关种类有性和无性阶段材料的 ITS 区序列进行比较分析, 从基因水平对冬虫夏草的无性阶段进行分子鉴定.

1 材料与方法

1.1 材 料 研究所用材料种名, 生活史阶段, 采集地等见表 1.

1.2 模板 DNA 的制备及 rDNA 特定区域的 PCR 扩增 采用 CTAB 法^[4] 提取虫草总 DNA. 提取的总 DNA 以 DPS 纯化系统 (包括玻璃粉, NaI) 纯化后再用于 PCR 扩增. PCR 引物为 LH2: 5' GTCGAATTCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA 3', D1a: 5' TTCCTGTTCCTGCGCCGTTACT 3', 分别对应于 18S rDNA 3' 末端和 26S rDNA 5' 端第 40~60 序列. PCR 反应程序为:

* 基金项目: 国家杰出青年基金 (39525007); 国家自然科学基金 (39770058)

收稿日期: 1998-05-10 第一作者简介: 赵锦, 女, 24 岁, 研究生

94 ℃ 4 min, 然后 94 ℃ 1 min, 50 ℃ 1 min, 72 ℃ 2min, 30 个循环. 扩增完成后, PCR 产物用 DPS 系统纯化, 沉淀晾干后另量 TE 溶解, 取 2 μL 于 φ 为 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检查, 其余 -20 ℃ 保存备用.

表 1 材料的种名, 生活史阶段, 采集地

Tab 1 The fungal species seage in life cycle and collected localities

名 称	生活史阶段	采集地/分离地	采集者/分离者
冬虫夏草 <i>Cordyceps sinensis</i>	有性阶段	西藏	李泰辉
中国被毛孢 <i>Hirsutella sinensis</i>	无性阶段	北京微生物所	郭英兰
中国拟青霉 <i>Paecilomyces sinensis</i>	无性阶段	广东省微生物所	章卫民
古尼拟青霉 <i>Paecilomyces gunnii</i>	无性阶段	广东省微生物所	章卫民

1.3 rDNA PCR 扩增产物的克隆及序列测定 PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统纯化后, 与质粒载体连接, 质粒载体为 pTZ19, 按文献 [5] 操作. 采用美国 Life Science Sequenase Version 2.0 (USB) 测序试剂盒直接测定重组质粒的 DNA 序列.

2 结果与分析

本实验采用双脱氧链终止法进行序列测定, 获得了 *C. sinensis*、*H. sinensis*、*P. sinensis*、*P. gunnii* ITS1 区的全部序列和 5.8S 的部分序列, *C. sinensis* 有性阶段 ITS1 区共有 182 碱基对, *H. sinensis* ITS1 区碱基数为 184, *P. sinensis*、*P. gunnii* 分别为 223 和 209, 序列的排列结果见图 1.

采用计算机分析软件 PCgene 6.0 和 Phylip 35 中的 DNAdist Program 计算不同种间的距离序数, 得出 *C. sinensis* 与 *H. sinensis* 的序列有很大的相似性 (97.8%), 与 *P. sinensis*、*P. gunnii* 种间的相似性则分别为 72.6% 和 72.2%; 这一结果清楚地表明 *C. sinensis* 与 *H. sinensis* 在分子水平上的一致性.

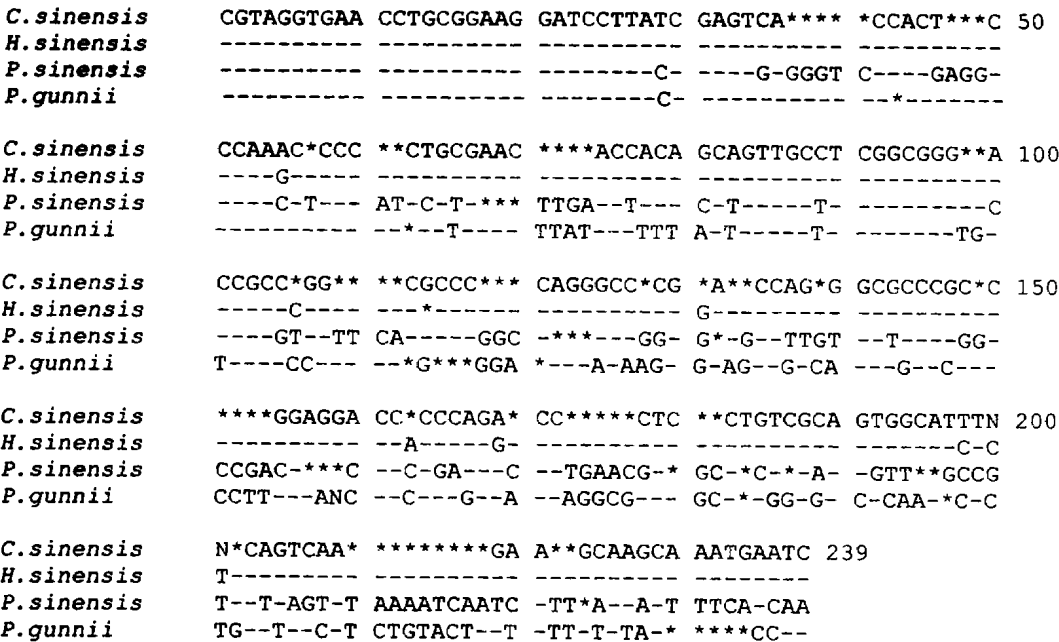


图 1 冬虫夏草及相关种类 rDNA ITS1 全序列

Fig 1 rDNA ITS1 sequence alignment of *Cordyceps sinensis* and its relate species

ITS1 区为高变区域, 从前人对真菌 rDNA ITS 区的研究结果^[6,7]看, 同一个生物种序列间核苷酸的相似性一般大于 90%。根据真菌核糖体 RNA 因结构进化规律, 序列间核苷酸的相似值若低于 90%, 通常作为不同种或不同属处理。 *C. sinensis* 与 *H. sinensis* 序列的相似性高达 97.8%, 显然是属于同一个生物种的不同生长阶段, 前者为其有性型 (有性生殖阶段), 后者则为其无性型 (无性生殖阶段)。本研究的分子生物学证据进一步证明刘锡进、郭英兰等^[3]的研究结果, 其分离培养物 *H. sinensis* 就是 *C. sinensis* 无性型。

3 讨 论

C. sinensis 应该只有一种无性型, 其他的则可能只是一些同时 (或随后) 生长在虫体上的嗜昆虫生真菌, 或者是其他长在或附在虫草菌上的杂菌。人们之所以能重复分离出某些杂菌, 原因可能是 *C. sinensis* 在自然界中主要分布于喜马拉雅山脉附近海拔 3 000~5 000 m 的高山草地上或较为寒冷的北方地区, 分离者按一般的习惯将分离物放在较高温的地方培养, 造成 *C. sinensis* 菌丝死亡, 而培养出那些经常与 *C. sinensis* 长在一起的真菌种类而被误认为是 *C. sinensis* 的无性型。

过去人们都在期望通过虫草属 *Cordyceps* 的子囊孢子及可能相关的无性型分生孢子的单孢子培养来证明虫草属的无性型, 但在许多情况下并不能成功^[8]。而现代的分子生物学方法则能解决这一难题开辟了新的途径和提供遗传本质上的科学证据。

致谢: 广东省微生物研究所郭英兰研究员、章卫民副研究员为本研究提供部分菌种, 特此致谢!

参考文献:

- [1] 陈庆涛, 肖生荣, 施至用. 中国拟青霉新种与虫草的关系. 真菌学报, 1984, 3 (1): 24~28
- [2] 李兆兰. 中国弯颈霉新种及产环孢菌素的研究. 真菌学报, 1988, 7 (2): 93~98
- [3] 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. 真菌学报, 1989, 8 (1): 35~40
- [4] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. Phytochem Bull, 1987, 19: 11~15
- [5] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996
- [6] HIBBETT D S. Ribosomal RNA and Fungal Systematics. Trans Mycol Japan, 1992, 33: 533~556
- [7] MONCALVO J M. Phylogenetic relationships in ganoderma inferred from the internal transcribed spacers and 25S Ribosomal DNA sequences. Mycologia, 1995, 87: 223~238
- [8] 敬一兵, 陆鲁生. 虫草. 昆明: 云南科技出版社, 1986. 1~156

Molecular Identification for the Asexual Stage of *Cordyceps sinensis*

ZHAO Jin^{*}, WANG Ning, CHEN Yueqin, LI Taihui, Qu Lianghu

Abstract: The molecular evidences which prove the asexual stage of *Cordyceps sinensis* is *Hirsutella sinensis*. rDNA ITS from *Cordyceps sinensis*, *Hirsutella sinensis*, *Paecilomyces sinensis*, *Paecilomyces gunin* were sequenced and compared. The results indicate that *C. sinensis* and *H. sinensis* have the highest homology (97.8%), while they have less similarity with the other 3 species (less than 70%), which suggested that the asexual stage of *C. sinensis* should be *Hirsutella sinensis*.

Keywords: *Cordyceps sinensis*, asexual stage, rDNA ITS, *Hirsutella sinensis*

^{*} Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China