

# 西藏冬虫夏草无性型 5.8S rDNA, ITS 间区 系统发育分析\*

赵泽孝<sup>1,2</sup>, 崔晓龙<sup>2</sup>, 丛严广<sup>1</sup>

(1. 第三军医大学 研究生管理大队, 重庆 400038; 2. 云南大学 云南省微生物研究所, 云南 昆明 650091)

**摘要:** 采用相对较低的培养温度(5~12℃), 从西藏那曲当年产风干冬虫夏草[*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.] 分离得到菌株 C21, 综合其菌丝形态学特征及 5.8S rDNA 和 ITS 间区的系统发育分析结果, 证实菌株 C21 为冬虫夏草菌的无性型, 即中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)。

**关键词:** 冬虫夏草; 形态特征; 5.8S rDNA; ITS 间区; 系统发育分析

**中图分类号:** Q 949.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2006)01-0083-05

冬虫夏草[*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.] 是一种极其珍贵的传统中药<sup>[1-5]</sup>, 近年的研究发现冬虫夏草菌能产生多种具有重要医学价值的生物活性物质<sup>[5-9]</sup>。自沈南英于 1983 年第 1 次报道分离得到冬草夏草菌无性型以来<sup>[9]</sup>, 迄今报道的无性型已多达 10 属 10 多个种<sup>[2, 4, 7, 8]</sup>, 但 5.8S rDNA 和 ITS 间区序列分析结果表明, 广泛分布于中国西部各省的冬虫夏草菌无性型均属于同一个种, 即中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)<sup>[2-5]</sup>。

为发酵法生产冬虫夏草菌丝体提供所需菌株, 并为冬草夏草的人工栽培打下坚实基础, 本文在前人研究基础上, 采用相对较低的分离温度, 综合菌丝形态学和分子生物学方法对分离菌株进行了鉴定, 证实得到的菌株为冬虫夏草菌的无性型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 冬虫夏草 2004 年 7 月, 作者于西藏那曲地区巴青县实地考察时购自当地牧民的自然风干品。菌株 C21 为作者采用前述样品于 2004 年 11 月分离所得。

1.1.2 培养基 采用改良 PDA 培养基(改良 PD

为其液体培养基): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 酵母粉 1 g, 胰蛋白胨 1 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.5。

### 1.2 方法

1.2.1 冬虫夏草菌的分离纯化及培养特征的观察

取上述风干虫草 1 枚, 以 75% 酒精棉球擦洗, 去除泥土等污物; 用 75% 酒精棉球擦洗、无菌水冲洗, 2% 红汞擦洗, 无菌水冲洗(每次擦洗后用无菌吸水纸吸干), 重复 3 次; 最后将子实体与虫体切开, 并分别切成 0.2 mm × 0.2 mm 小块, 接种于上述改良 PDA, 置室温(5~12℃)培养 2 个月后, 再置 18℃ 下培养 1 个月, 观察分离株的菌落特征。

将分离得到菌株的菌丝体捣碎后接种于上述改良 PD 中, 于 19℃ 下摇瓶培养 1 个月; 挑取产黑褐色色素, 培养液清亮之培养瓶中的菌块, 转接于上述改良 PDA 斜面, 再重复 1 次, 即得到纯菌。将纯菌接于改良 PDA 斜面及平板上, 分别置于 6~12, 13~15, 18~22℃ 及 25℃ 下培养 1 月, 观察其最适生长温度及菌落特征。将纯菌采用埋片法接于上述改良 PDA, 于 18℃ 下培养 6 周, 从第 3 周起每周取 1 片进行菌丝形态观察、照相并记录。

1.2.2 5.8S rDNA 和 ITS 间区序列的测定及系

\* 收稿日期: 2005-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(30260004; 30460004)。

作者简介: 赵泽孝(1973-), 男, 四川人, 硕士生, 主要从事极端环境微生物资源方面的研究。

统发育分析 全基因组 DNA 的提取,引物的选取,5.8S rDNA 和 ITS 间区的扩增及测序按陈月琴的方法<sup>[3,5]</sup>.根据 BLAST 的结果,采用 Clustal X 1.8 及 TreeView 进行比对并建树<sup>[9]</sup>,分析得到分离菌株与已知菌株 5.8S rDNA 和 ITS 间区的相似性.选取 6 个不同地域来源的 *C. sinensis* (ZWM003, ZWM004, *H. sinensis* HMAS55469, LiT9704SI, CYQ011, ZHY021) 菌株与 *Cordyceps cochliidiicola*, 分析其 ITS1, 5.8S rDNA 和 ITS2 3 个区在种间、种内的相对变异程度.

1.2.3 基因库序列号(均为 NCBI 登录号) 本次分离株 C21 序列号为 DQ121377, 其它相关菌株的序列号如下: *C. sinensis* ZWM001 AJ507399, *C. sinensis* ZWM002 AJ507400, *C. sinensis* ZWM003 AJ507401, *C. sinensis* ZWM004 AJ507402, *C. sinensis* LiT9807As AJ243776, *C. sinensis* LiT9807Sc AJ243775, *C. sinensis* LiT9704SI AJ245559, *H. sinensis* Zhw01 AJ243979, *C. sinensis* WNS03 AJ413183, *H. sinensis* HMAS55469 AJ243980, *C. sinensis* LCY9903 AJ413182, *C. sinensis* ZHY021 AJ507405, *C. sinensis* CYQ011 AJ507403, *Cordyceps cochliidiicola* AB027377, *Haptocillium balanoides* CBS 522. 80 AJ292413, *Paecilomyces sinensis* ZHW02 AJ243771, *Verticillium bubillosum* JCM9214 AF048741, *Cephalosporium maydis* 222 AJ010026, *Stachybotrys dichroa* ATCC18913 AF081472, *Beauveria caledonica* CCRC32867 Z54104.

## 2 结果分析

2.1 分离及培养特征 经过 3 个月的分离培养,

最终仅从虫体菌肉块为分离块之斜面得到菌株,形成直径 0.9 cm, 高约 0.6 cm, 产水溶性褐色色素, 表面产稀疏菌丝, 质地紧实, 中空黄褐色菌落, 培养基变干时空处贮有一小水滴. 以子实体为分离块的斜面均被细菌污染而失败. 纯化后转接而形成的菌丝体完全变黑, 且其在 6~12 °C 下产色素能力明显强于在 13~15 °C 及 18~22 °C, 而在 18~22 °C 下表面菌丝生长相对最旺盛; 在 25 °C 下菌丝有极微弱生长, 但极易失活.

纯化菌株 C21 的埋片观察结果如图 1(1(a) 为孢子形态, 1(b) 为菌丝形态) 所示, 菌丝无色, 直或弯曲, 光滑有隔, 粗 2~6 μm. 分生孢子梗平滑无色, 呈瓶形. 分生孢子单生, 无色, 肾形或长椭圆形, 6 μm × 2 μm.

2.2 系统发育分析 对菌株 C21 进行系统发育分析. 对 ITS1, 5.8S rDNA 和 ITS2 的序列比对结果如图 2, 从图上可看出不同地域来源菌株的 ITS1, ITS2 种内差异很小, 而种间差异明显; 但 5.8S rDNA 的种间和种内差异不明显. 以 *Beauveria caledonica* CCRC32867 为外群, 基于 ITS1, 5.8S rDNA 和 ITS2 构建系统发育树如图 3. C21 与各比对菌株的相似性为: *C. sinensis* CYQ011 99.8%, *C. sinensis* LiT9704SI 99.6%, *C. sinensis* LiT9807Sc 99.6%; *Cordyceps cochliidiicola* 89.9%, *Haptocillium balanoides* CBS522. 80 87.1%, *Paecilomyces sinensis* ZHW02 70.0%, *Verticillium bubillosum* 66.7%, *Cephalosporium maydis* 73.8%, *Stachybotrys dichroa* ATCC18913 79.3%.

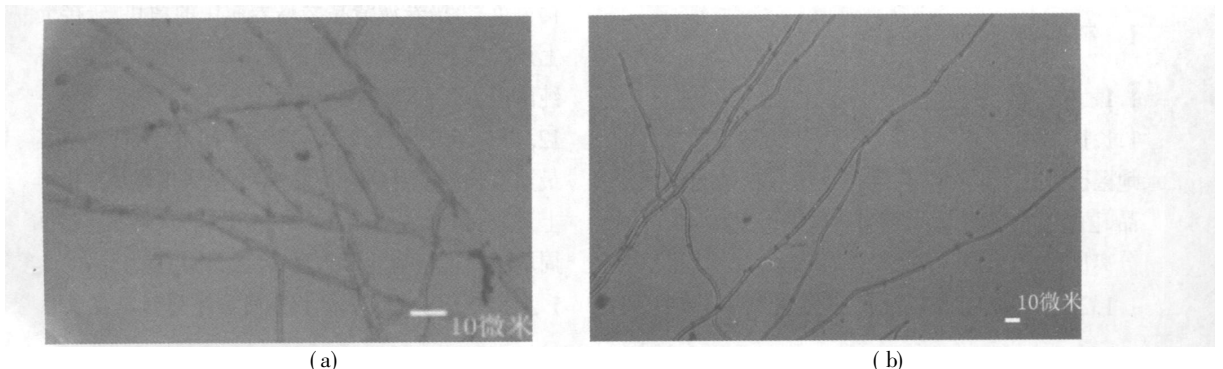


图 1 *Cordyceps sinensis* 无性型分生孢子和菌丝形态

Fig. 1 Morphology of conidium and mycelium of anamorph of *Cordyceps sinensis*

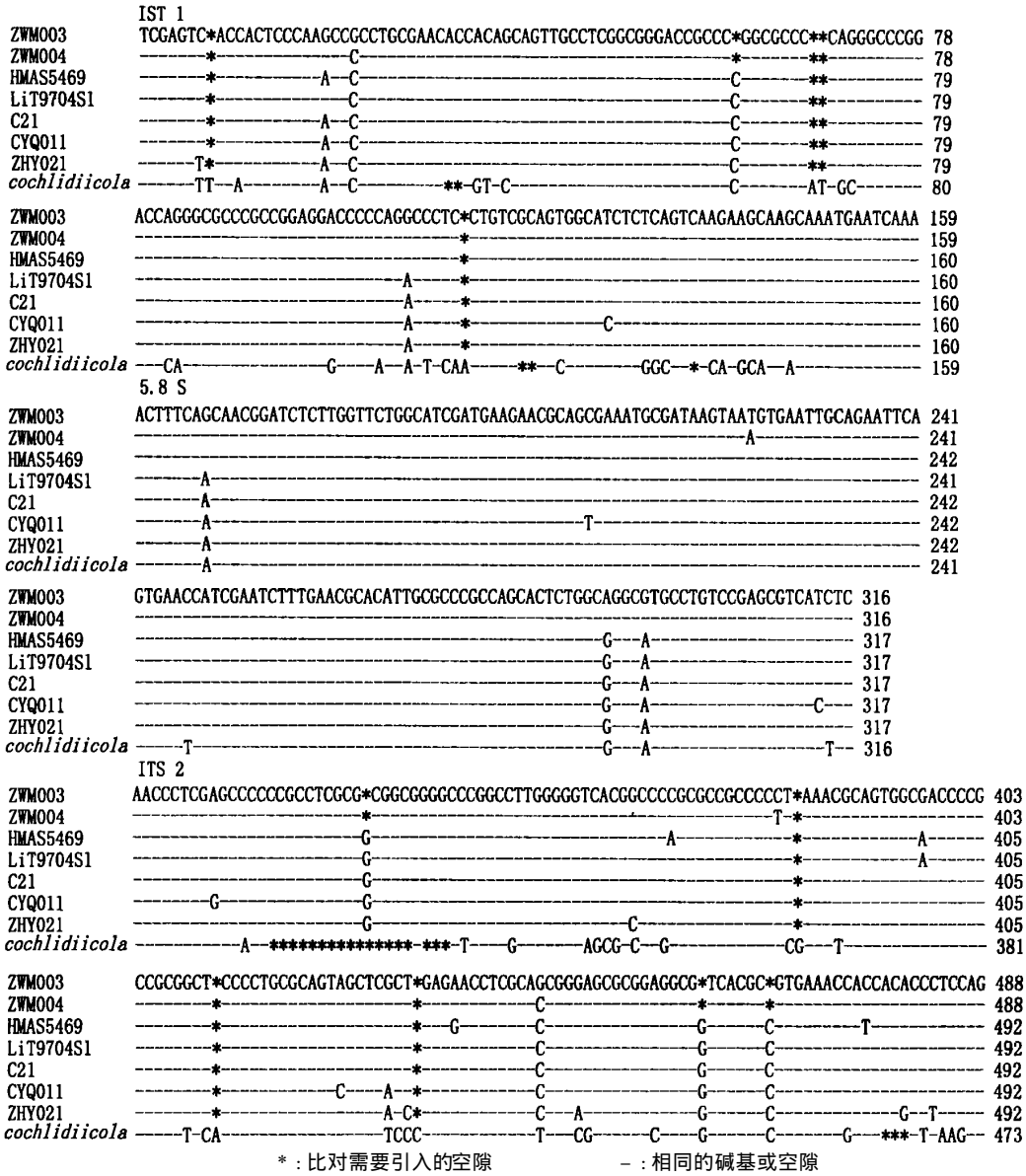


图 2 *Cordyceps cochlidicola*, *Cordyceps sinensis* 及其无性型 rDNA ITS 间区和 5.8S rDNA 基因比对

Fig. 2 Sequence alignment of rDNA ITS regions and 5.8S rRNA gene from *Cordyceps cochlidicola*, *Cordyceps sinensis* and its anamorph.

### 3 讨论

从分离结果看,应用组织块分离,选用冬虫夏草虫体菌肉块比子实体更易分离成功。分离菌株为黄褐色并产水溶性黄褐色色素,纯化后转接所形成的菌丝体则呈黑褐色并产水溶性黑褐色色素,色素的变化与章卫民的结果一致<sup>[4]</sup>。菌丝及分生孢子形态与李增智的结果一致<sup>[2]</sup>。观察各温度下菌丝的生长结果,菌株 C21 的最适生长温度为 19~20℃。从系

统发育分析可以看出 C21 与源自各地的冬虫夏草子实体均具有极高的同源性,且与同属不同种的 *Cordyceps cochlidicola* 相似较高,而与 *Paecilomyces sinensis* ZHW02, *Verticillium babilosum* JCM9214, *Cephalosporium maydis* 222 及 *Stachybotrys dichroa* ATCC18913 的同源性程度均低于种内水平<sup>[10]</sup>,由此可看出 C21 为 *Cordyceps sinensis* 的无性型。此结果也进一步证实了 ITS1, 5.8S rDNA 和 ITS2 间区在虫草菌分类上具有重要的价值。

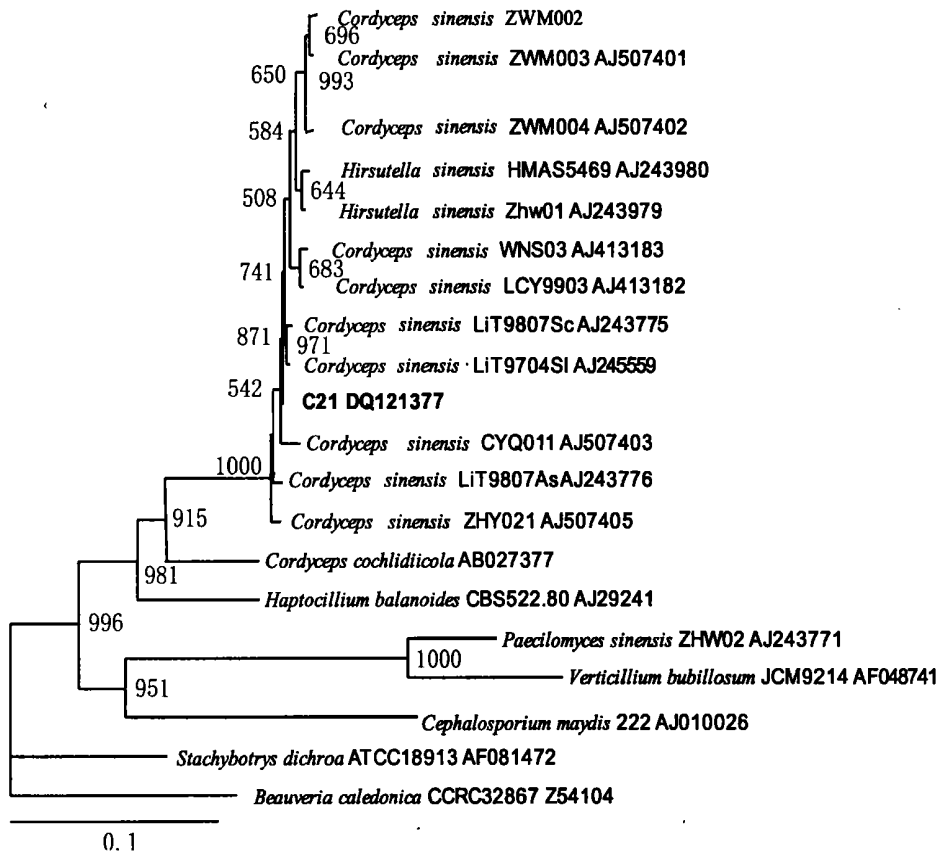


图 3 基于 ITS1, 5.8S rDNA 和 ITS2, 采用邻接法构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 was constructed from evolutionary distances by using neighbour joining method

综合形态学及系统发育分析结果, 认为所得到的菌株 C21 为冬虫夏草菌无性型, 即中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*)。

致谢: 感谢云南大学云南省微生物所的姜成林研究员对本研究的耐心指导。

### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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: 中国被毛孢与冬虫夏草的关系[J]. 菌物系统, 2000, 19(1): 60-64.
- [3] CHEN Yue qin, WANG Ning, QU Liang hu, 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]. Biochem Syst Ecol, 2001, 29: 597-607.
- [4] 章卫民, 李泰辉, 陈月琴, 等. 西藏冬虫夏草无性型的生物学研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(3): 54-58.
- [5] CHEN Yue qin, HU Bo, XU Fei, et al. Genetic variation of *Cordyceps sinensis*, a fruit body producing entomopathogenic species from different geographical regions in China[J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 230: 153-158.
- [6] ZHU J S, HALPERN G M, JONES K. The scientific re-discovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: *Cordyceps sinensis*: Part I [J]. J Altern Complement Med, 1998, 4(3): 289-303.
- [7] 邓岚, 马耀辉. 人工培养虫草菌分离单体 ST 的生物活性研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2003, 25(增刊): 38-41.
- [8] 邓岚, 马耀辉, 苏任, 等. 虫草菌多糖的部分理化性质研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2003, 25(增刊): 35-37.
- [9] 沈南英, 曾璐, 张显耻. 冬虫夏草菌的分离[J]. 食用菌, 1983, 5: 1-3.
- [10] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice

[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 4 673- 4 678.

## Phylogenetic analysis based on 5. 8S rDNA and ITS spacer of anamorph of *Cordyceps sinensis* from Tibet

ZHAO Ze xiao<sup>1, 2</sup>, CUI Xiao long<sup>2</sup>, CONG Yarr guang<sup>1</sup>

(1. Post graduate Institute, Third Military Medicine University, Chongqin 400038, China;

2. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** Strain C21 was isolated from well preserved air drying fruit body of *Cordyceps sinensis*, from Nagqu, Tibet. Morphological characteristics of strain C21 were found closely similar with *Hirsutella sinensis*, and 5. 8S rDNA & ITS of C21 shared over 99. 6% similarity with those of *C. sinensis* CYQ011, *C. sinensis* LiT9704SI and *C. sinensis* LiT9807Sc. Based on these results, stain C21 was identified as anamorph of *Cordyceps sinensis*, namely *Hirsutella sinensis*.

**Key words:** *Cordyceps sinensis*; morphology; 5. 8S rDNA; ITSs; phylogenetic analysis

\* \* \* \* \*

(上接第 82 页)

**Abstract:** Wild rice is important heritable material. There are abundant wild rice in Yunnan province. The contents of amino acids, carbon and nitrogen of a few kinds of wild rice and cultivated rice's stem, leaves and seeds were analyzed. The results showed that there were obvious differences in total amino acid content among the concerned materials. *Oryza minuta* has the highest content, 56. 8 mg/g. Wild field collected Yuanjiang type of *Oryza rufipogon* has the least content, 22. 8 mg/g. The variation of calculated C/ N ratio and protein content were within 12—38 and 6%—20% respectively. The relativity of the contents and components of amino acids in wild rice tissues and seeds were also analyzed. We found that the amount of amino acids in plant tissues can reflect that of seeds, to some extent. The application on assessment of tissue amino acids and C/ N ratio in plant germplasm resources were also discussed.

**Key words:** wild rice; amino acid; C/ N ratio