

西藏冬虫夏草无性型的分子生物学研究*

章卫民¹ 李泰辉¹ 陈月琴² 屈良鹄² 钟 韩¹ 徐学平¹

(广东省微生物研究所 广州 510070)¹ (中山大学生物工程研究中心 广州 510275)²

摘要: 从西藏采集的冬虫夏草子实体中分离出3个菌株 C₃、C₄、C₅, 通过培养特征的研究以及采用分子生物学方法, 以 rDNA ITS 区为分子指标, 与冬虫夏草 [*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.] 的有性世代及中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu & Zeng) 进行比较分析, 发现 C₄ 的培养特征与 C₃、C₅ 完全不同, 其序列与冬虫夏草的相似率为 93%, 与中国被毛孢的相似率为 94%, 而 C₃、C₅ 与冬虫夏草的相似率很低 (分别为 55% 和 69%), 从而证明 C₄ 是西藏冬虫夏草的无性型, 为中国被毛孢。

关键词: 冬虫夏草, 中国被毛孢, 无性型, rDNA ITS 区, 西藏

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0054-06

MOLLECULAR STUDY ON ANAMORPH OF *CORDYCEPS SINENSIS* FROM TIBET

ZHANG Wei-Min¹ LI Tai-Hui¹ CHEN Yue-Qin² QU Liang-Hu² ZHONG Han¹ XU Xue-Ping¹

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)¹

(Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275)²

Abstract: 3 strains of C₃, C₄ and C₅ were isolated from ascocarps of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. collected from Tibet. Through a study of culture characteristics of the 3 strains, sequencing and comparing rDNA ITS of them with those of *C. sinensis* and *Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu & Zeng, it was found that the culture characteristics of C₄ are obviously different from those of C₃, C₅ and it has a similarity of 93% with *C. sinensis* and a similarity of 94% with *H.*

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39770058, 39870044)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39770058, 39870044)

国家杰出青年科学基金资助项目 (No. 39525007)

广东省自然科学基金资助项目 (No. 010844)

收稿日期: 2001-04-25, 修回日期: 2001-06-25

sinensis while the strains of C_3 and C_5 have much less similarity with *C. sinensis* (55% and 69% respectively). The results prove that C_4 is the anamorph of *C. sinensis* from Tibet, which is *H. sinensis*.

Keywords: *Cordyceps sinensis*, *Hirsutella sinensis*, Anamorph, rDNA ITS, Tibet

据记载, 虫草属 [*Cordyceps* (Fr.) Link] 的种类有 300 多种^[1], 其中我国记载有药用价值的种类有冬虫夏草 [*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.]、蛹虫草 [*C. militaris* (L. ex Fr.) Link]、亚香棒虫草 (*C. hawkesii* Gray)、蝉花 [*C. sobolifera* (Hill.) B. et Br.]、珊瑚虫草 (*C. martialis* Speg.)、大团囊虫草 [*C. ophioglossoides* (Ehrenb.) Link]、古尼虫草 [*C. gunnii* (Berk.) Berk.] 等^[2], 其中以冬虫夏草最为著名。由于冬虫夏草资源稀少, 且过度采挖又会严重破坏生态环境, 而人工栽培冬虫夏草难度很大。因此, 人们企图从冬虫夏草分离出菌种, 即无性型菌株, 通过发酵法生产菌丝体作为冬虫夏草的替代品。十多年来, 国内在冬虫夏草无性型的研究方面却引起了较大的争议, 成为人们关注的热点。迄今为止, 报道的冬虫夏草无性型种类已达 10 个属的 10 多个种。通过形态特征的研究, 自不同产地的冬虫夏草中分离得到的菌株分别被沈南英等^[3], 陈庆涛等^[4], 李兆兰等^[5,6], 戴如琴等^[7], 刘锡琚等^[8], 印象初等^[9], 梁宗琦^[10] 等人鉴定为头孢霉 (*Cephalosporium* sp.)、中国拟青霉 (*Paecilomyces sinensis* Chen, Xiao & Shi)、蝙蝠蛾柱霉 (*Scytalidium hepiali* Li)、中国弯颈霉 (*Tolypocladium sinense* Li)、蝙蝠蛾拟青霉 (*Paecilomyces hepiali* Chen & Dai)、中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu & Zeng)、中国金孢霉 (*Chryso sporium sinense* Liang)、蝙蝠蛾被孢霉 (*Mortierella hepiali* Chen & Lu)、圆柱菌 (*Scytalidium* sp.) 等。在这些已鉴定的冬虫夏草无性型中, 究竟哪个种才是正确的, 或者是否存在因冬虫夏草产地的不同存在不同的无性型, 还是冬虫夏草由于多个虫生真菌的并存而导致它本身就存在多个无性型? 刘锡琚等^[8] 在分离四川康定产的冬虫夏草过程中, 虽然有拟青霉属 (*Paecilomyces*) 的菌出现, 但发生的频率低且无规律性。梁宗琦^[11] 认为中国被毛孢是冬虫夏草正确的无性型。随着分子生物学技术在真菌物种鉴定中的应用, 冬虫夏草无性型的研究取得了很大的进展。赵锦等^[12] 采用分子生物学手段发现冬虫夏草与中国被毛孢的序列有很大的相似性 (97.8%), 从分子水平证明了冬虫夏草的无性阶段是中国被毛孢, 而中国拟青霉与冬虫夏草的相似率仅为 72.6%。李增智等^[13] 从青海省海东平安县产的冬虫夏草子实体上分离出中国被毛孢, 通过 PCR 技术获得了冬虫夏草和中国被毛孢相应的基因组 DNA 指纹图谱, 两者相似率高达 96%, 从而表明冬虫夏草的无性型为中国被毛孢, 同时将分离自冬虫夏草的中国拟青霉、中国金孢霉和虫生簇孢 (*Sporothrix insectorum* de Hong & Evans) 作为冬虫夏草的假定无性型, 与冬虫夏草、中国被毛孢作平行测定, 结果表明它们的 DNA 指纹图谱相似性很低, 从而排除了它们作为冬虫夏草无性型的可能性。

为了进一步确证冬虫夏草的无性型, 本研究对自西藏那曲地区采集分离得到的 3 个菌株 C_3 、 C_4 、 C_5 , 通过培养特征和分子生物学的研究, 对西藏冬虫夏草的无性型进行鉴别。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 冬虫夏草: 1998 年由作者采自西藏, C_3 、 C_4 、 C_5 由作者于 1999 年 5 月分离自西

藏那曲地区产的冬虫夏草；中国被毛孢：由中国科学院微生物研究所赠。

1.1.2 培养基：采用本所用于培养虫草菌的 C_8 培养基。

1.2 方法

1.2.1 冬虫夏草的分离：将新鲜的冬虫夏草冲洗干净，凉干后用酒精对虫体表面消毒，用无菌手术刀切取虫体表皮内白色的菌肉组织，置于斜面培养基上，在 $15^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ 下培养。

1.2.2 DNA 的提取、纯化及 PCR 扩增：采用 CTAB 法^[14] 提取冬虫夏草、中国被毛孢及分离菌株的总 DNA。提取的总 DNA 采用 DPS 纯化系统纯化后进行 PCR 扩增。PCR 引物为 LH2: 5' GTCGAATTCGTAGGTGAACCTGCCGAAGGATCA 3', D1a: 5' TTCCTGT-TCACTCGCCGTTACT 3', 分别对应于 18S rDNA 3' 末端和 26S rDNA 5' 端第 40-60 序列。扩增反应: 95°C 4min, 94°C 1min, 50°C 1min, 72°C 2min, 30 个循环。PCR 产物用 DPS 系统纯化后在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳。

1.2.3 PCR 扩增产物的克隆及序列测定：扩增产物的克隆与质粒载体连接，质粒载体为 pTZ19，采用美国 Life 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

2.1 冬虫夏草分离菌株的培养特征

C_4 的培养特征：在 18°C 下虫体上的菌肉组织约在一个星期后长出白色继而转为棕黄色的稀疏菌丝体；组织块由白色转变成黄褐色至黑褐色，并有黑色色素渗入培养基内；纯化后，接种体也会变黑，并有黑色色素渗入培养基内。菌落生长极为缓慢，约 3 个月后长成蚯蚓粪状隆起的白色至灰白色的子座组织，致密，肉质，脆，内部空心，背面黑褐色。转管后在 25°C 下培养易失活。 C_3 、 C_4 、 C_5 的培养特征比较见表 1。

表 1 冬虫夏草分离物 C_3 、 C_4 、 C_5 培养特征的比较

菌株	菌落颜色	质地	生长速度	最适温度	25°C 下的生长状况
C_4	初白色或棕黄色后白色至灰白色、背面黑褐色	致密、肉质、表面蚯蚓粪状隆起	极慢	$15^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$	易失活
C_3	灰白色至灰色、背面淡黄褐色	松软、絮状	较快	$24^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$	较旺盛
C_5	纯白色、背面淡黄褐色	松软、绒状	快	$20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$	旺盛

从表中可以看出，这 3 个分离物的培养特征均不相同，应为 3 个不同的种。 C_4 的培养特征与 C_3 、 C_5 差异显著，它与刘锡璠等^[8] 的描述基本一致，因而认为可能是中国被毛孢。

2.2 ITS1 区序列分析

采用双脱氧链终止法进行序列测定，获得了冬虫夏草、中国被毛孢以及 C_3 、 C_4 、 C_5 ITS 区的全序列，它们在 ITS1 区的碱基数分别为 182、184、198、180、183。采用 CLUSTAL X (1.8) multiple sequence alignment 程序校排这 5 个种的序列，排列结果见图 1，以相邻法 (Neighbour Joining) 程序获得无根树图 (图 2)。根据相似率分析公式^[15] 计算 C_3 、 C_4 、 C_5 与冬虫夏草的相似率，结果 C_4 与冬虫夏草的相似率为 93%，与中国被毛孢的相似率为 94%，而 C_3 、 C_5 与冬虫夏草的相似率分别为 55% 和 69%。这表明 C_4 与

冬虫夏草和中国被毛孢在基因水平上是一致的，而 C₃、C₅ 与冬虫夏草则相差甚远。根据国际分子生物学数据库 GenBank，发现 C₃ 为细柄拟青霉 (*Paecilomyces tenipes*)，两者的相似率为 94%，C₅ 为雪白弯颈霉 (*Tolyocladium niveum*) [膨大弯颈霉 (*T. infatum*) 为其异名]，两者的相似率为 98%。从图 2 中也可清楚地看出 C₃、C₄、C₅ 与冬虫夏草及中国被毛孢在基因水平上的相互关系。

<i>H. sinensis</i>	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCCTTATCGAGTC-ACCACTCCCAAGCCCCCTGCGAAC
C ₄	---GGT-ATCCTCGGGAAGGATCATTATCGAGTC-ACCACTCCCAAAACCCCCCTGCGAAC
<i>C. sinensis</i>	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCCTTATCGAGTC-ACCACTCCCAAAACCCCCCTGCGAAC
C ₅	--GGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCCAGTT-ATCAACTCCCAAAACCCCCCTGTGAAC
C ₃	-----NCCTGCGGAAGGATCATNATANAGTTTACAACCTCCCAAAACCCCTATGTGAAC
<i>H. sinensis</i>	ACCACAGCAGTTGCCTCGGCGGGACCGCCC-GGC-CCCCAGGG-----
C ₄	ACCACAGCAGTTGCCTCGGCGGGACCGCCCCGGCGCCCCAGGG-----
<i>C. sinensis</i>	ACCACAGCAGTTGCCTCGGCGGGACCGCC--GGCGCCCCAGGG-----
C ₅	ATACCCAACGTTGCTTCGGCGGGACCGCCCCGGCGCCTCGCGCT-----
C ₃	ATACCTATGTTGCTTAGGCGGACTCGCCCCGGCGTCCGGACGGCCTCGCACCGACCTCG
<i>H. sinensis</i>	-CCCGACCAGGGCGCCCGCCGGAGGACCACCAGACCCCTCCTGT---CGCAGTGGCAT-
C ₄	-CCCGACCAGGGCGCCCGCCGGAGGACC-CCCAGACCCCTCCTGT---CGCAGTGGCAT-
<i>C. sinensis</i>	-CCCG-ACCAGGGCGCCCGCCGGAGGACC-CCCAGACCCCTCCTGT---CGCAGTGGCAT-
C ₅	-CCCGAACCAAGCGCC-GCCGGAGGACC---CAAACCTTTGTTAACCATAGTGGCATA
C ₃	GTCCGGACCAGGCGCCCGCCGGAGACCC--TCAAACCTATGTATTATCAGCATCTTCAT-
<i>H. sinensis</i>	CTCTCAGTCAAGAAGCAAG-CAAATGAATC
C ₄	CTTTCAGTCAAGAAGCAAG-CAAATGAATC
<i>C. sinensis</i>	TTNNCAGTCAAGAAGCAAG-CAAATGAATC
C ₅	TTCTGAGTCTCACAAGAA---AAATGAATC
C ₃	GAATACGCCCAAGGCAAAACAAATGAATC

图 1 冬虫夏草、中国被毛孢及分离物 C₃、C₄、C₅ 的 rDNA ITS1 序列校排结果

3 讨论

从冬虫夏草分离物的培养特征及 ITS1 区序列分析结果表明 C₄ 与中国被毛孢是一致的，证明分离自西藏产冬虫夏草的菌株 C₄ 是冬虫夏草的无性型，为中国被毛孢。尽管 C₃ 与 C₅ 也是从冬虫夏草中分离得到，但它们在培养特征上与 C₄ 完全不同，应属不同的种类。经 ITS1 区序列分析的结果表明，C₃、C₅ 与冬虫夏草的相似率很低，根据国际

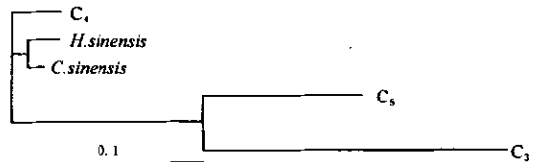


图 2 以冬虫夏草、中国被毛孢及分离物 C₃、C₄、C₅ 的 rDNA ITS1 序列分析构建的无根树图

分子生物学数据库 GenBank，它们分别属于拟青霉属和弯颈霉属的种类。因此，从西藏冬虫夏草分离得到的 3 个菌株中，只有 C₄ 才是冬虫夏草的无性型，而 C₃、C₅ 则是虫体上的杂菌。过去曾有冬虫夏草的无性型是拟青霉属或弯颈霉属种类报道，可见这两

个属的种类是冬虫夏草中常见的杂菌或伴生菌。

根据前人和本研究的结果, 作者认为无论冬虫夏草产自何地, 或从中分离到多少个菌株, 它的无性阶段只有一个, 即中国被毛孢, 不存在不同产地不同的无性型或多个虫生真菌并存而有多个无性型的现象。由于不同地区的冬虫夏草可能存在遗传分化, 因而不同产地冬虫夏草的核苷酸与中国被毛孢的相似性并不完全相同, 但从都超过了90%的结果来看, 不同产地的冬虫夏草应属于同一个种。在国内有关学者提出的10多个冬虫夏草无性型中, 看来应该只有中国被毛孢才是冬虫夏草真正的无性型, 而其它种类则值得怀疑, 有待作进一步研究。如果是由于命名上的问题, 与中国被毛孢为同种异名则另当别论。梁宗琦^[11]认为未合格发表的中国头孢霉和晚发表的中华束丝孢均为中国被毛孢的异名。因此, 最好能将这冬虫夏草无性型全部作DNA序列比较分析才能最终加以鉴别。

由于真正冬虫夏草无性型的生长温度低, 生长速度极为缓慢, 因此利用冬虫夏草无性型原始菌株通过发酵法工厂化生产菌丝体作为冬虫夏草的替代品, 目前看来还是比较困难的, 因为它的生产成本将会很高。有不少研究表明, 分离自冬虫夏草的蝙蝠蛾拟青霉 (*Paecilomyces hepiali*)、蝙蝠蛾被孢霉 (*Mortierella hepiali*)、中国弯颈霉 (*Tolyptocladium sinense*)、圆柱菌 (*Scytalidium* sp.) 等其培养产物在成分分析、药理甚至临床方面的试验结果与天然冬虫夏草基本一致, 这些菌株可在较高温条件下培养, 且生长速度又快, 通过发酵生产菌丝体成本较低。因此, 国内有关生产厂家利用这些假定无性型菌株将发酵生产的菌丝体称为“冬虫夏草菌丝体”或“虫草菌丝体”, 这还有待作进一步的研究才能确定是否能下此定义, 因为这些生产菌种可能并非真正的冬虫夏草无性型。这些菌株的培养产物之所以具有与冬虫夏草相似的化学成分和药理作用, 可能与它们喜附生于冬虫夏草的特性有关。虫草属的其它药用种类如蛹虫草、亚香棒虫草、蝉花、古尼虫草等的无性型已研究得比较清楚, 比起冬虫夏草无性型菌株来, 这些虫草种类的无性型菌株对培养条件要求不高, 生长速度快, 因此可以利用它们生产相应种类的虫草菌丝体。

致谢 中国科学院微生物研究所郭英兰研究员为本研究提供中国被毛孢菌种, 特此致谢!

参 考 文 献

- [1] 清水大典. 原色冬虫夏草图鉴. 东京: 诚文堂新光社, 1994, 208~209.
- [2] 应建浙, 卯晓岚, 马启明, 等. 中国药用真菌图鉴. 北京: 科学出版社, 1987, 12~13.
- [3] 沈南英, 曾璐, 张显趾. 食用菌, 1983, 5: 1~3.
- [4] 陈庆涛, 肖生荣, 施至用. 真菌学报, 1984, 5(3): 109~122.
- [5] 李兆兰, 孙云汉. 真菌学报, 1988, 7(1): 23~28.
- [6] 李兆兰. 真菌学报, 1988, 7(2): 93~96.
- [7] 戴如琴, 兰丽江, 陈伟华, 等. 北京农业大学学报, 1989, 15(2): 221~225.
- [8] 刘锡璠, 郭英兰, 余永年, 等. 真菌学报, 1989, 8(1): 35~34.
- [9] 印象初, 沈南英. 高原生物学季刊(第9集). 北京: 科学出版社, 1990, 1~5.
- [10] 梁宗琦. 真菌学报, 1991, 10(1): 50~56.
- [11] 梁宗琦. 贵州农学院丛刊, 1994, 增刊(26): 1~21.
- [12] 赵锦, 王宁, 陈月琴, 等. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(1): 121~123.
- [13] 李增智, 黄勃, 李春如, 等. 菌物系统, 2000, 19(1): 60~64.
- [14] Doyle J J, Doyle J L. Phytochem Bull, 1987, 19: 11~15.
- [15] Nei M, Li W H. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269~5273.