

张宗豪,李玉玲. 冬虫夏草粉红菌株的分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):59-63.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.016

# 冬虫夏草粉红菌株的分子鉴定

张宗豪,李玉玲

(青海大学畜牧兽医科学院,青海西宁 810016)

**摘要:**在冬虫夏草真菌培养过程中,菌株 SH-1 菌丝产生粉红色变化的现象,粉红菌株 ZH-1 与正常菌株 SH 形态存在很大差异。菌株 SH-1 与粉红菌株 ZH-1 的 ITS 序列比对鉴定结果表明,11 株 SH-1 和 2 株 ZH-1 都能扩增出条带,条带清晰且稳定,分布在 500~750 bp 范围内,13 株菌株在 GenBank 中应用 Blast 比对都与 *Paecilomyces* sp. Cs-4(EU328187)的相似性达到了 100%。用 3 种方法对 13 株菌株 ITS 序列与分离自冬虫夏草的 32 株真菌 ITS 序列(下载自 GenBank)构建系统进化树,3 种方法都显示 13 株菌株与蝙蝠蛾拟青霉分为 1 支,可以确定粉红菌株 ZH-1 与正常菌株 SH-1 为同一个种,即蝙蝠蛾拟青霉。

**关键词:**冬虫夏草;分子鉴定;粉红变化;ITS 序列;系统进化树

**中图分类号:**S567.3\*50.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)07-0059-05

冬虫夏草[*Cordyceps sinensis* (BerK.) Sacc.]属真菌界(Fungi)子囊菌纲(Ascomycotetes)肉座菌目(Clavicipitales)麦角菌科(Clavaicipiaceae)冬虫夏草属(*Cordyceps*)的冬虫夏草菌(*Cordyceps sinensis*)寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体<sup>[1]</sup>,《中华人民共和国药典》对其功用的描述是:“补肺益肾,止血化痰。用于久咳虚喘,阳痿遗精,腰膝酸痛”。冬虫夏草主要分布在我国的青海、西藏、四川、甘肃等省(区)海拔 3 000~5 000 m 的部分地区,冬虫夏草是主产区群众经济财源的重要组成部分<sup>[2]</sup>。近年来冬虫夏草采挖严重过度,使冬虫夏草野生资源濒临枯竭,野生冬虫夏草生产面积正在逐年缩小,产量也随之大降<sup>[3]</sup>。

冬虫夏草人工培育的菌丝体成分、含量与天然冬虫夏草非常相似,是天然冬虫夏草最适替代品<sup>[4-6]</sup>。在本实验室静止培育冬虫夏草菌株 SH-1 的过程中,发现部分培养瓶内菌丝体生长到一定时期,从中间开始转化成粉红色,逐步蔓延到瓶壁,原先的粗糙表面变成有张力、有韧性的光滑表面,富含水分,周围又形成多层毛刺状结构,生长瓶内培养物往往形成一个整体,周围与瓶壁紧密结合,培养物颜色鲜艳,整体呈果冻状。把产生变化后的粉红色菌株编号为 ZH-1。

基因序列在生物进化过程中的改变速率是一定的,目前对真菌分子系统学研究的基础方法之一是对菌体的某一段 DNA 序列进行同源性比较,构建系统树,以此探讨它们的系统演化关系。本研究利用 ITS1-5.8S-ITS2 序列构建系统进化树来验证正常菌株 SH-1 与粉红菌株 ZH-1 的亲缘关系,为探讨产生粉红菌株的机理提供数据支持和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、仪器、试剂

(1)供试菌种:冬虫夏草菌由青海省畜牧兽医科学院纯化培养,编号为 SH-1,由 SH-1 转变来的粉红菌株编号 ZH-1,保存于笔者所在研究室。(2)主要仪器:组培瓶、高压灭菌锅、超净工作台、多功能光照培养箱、FA1004 电子分析天平。(3)分离用固体培养基(改良 PDA 培养基):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15~20 g,牛肉膏 3 g,自来水补足至 1 000 mL,自然 pH 值。(4)培养用液体培养基:每 200 mL 溶液中含马铃薯 20 g,胡萝卜 10 g,氮源 A 45 mL,氮源 B 5 g,葡萄糖 8 g,  $\text{MgSO}_4$  0.1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.4 g。

### 1.2 方法

1.2.1 总基因组 DNA 的提取 (1)样品的处理:取新鲜样品 100 mg,用适量的液氮重复研磨 3 次,并加入溶液 A 200  $\mu\text{L}$ ,用玻璃研磨器适当研磨,加入 20  $\mu\text{L}$  RNase A,再加入 100 mg 玻璃珠,在高速振荡器上振荡 5 min。干品须在烘箱中干燥 2 h,取 50 mg 进行上述操作。(2)加入 20  $\mu\text{L}$  10 mg/mL 的蛋白酶 K,充分混匀,55  $^{\circ}\text{C}$  水浴消化 30 min。消化期间可颠倒离心管混匀数次,12 000 r/min 离心 2 min。将上清转移到 1 个新的离心管中,如有沉淀,可再次离心。(3)在上清中加入 200  $\mu\text{L}$  溶液 B,充分混匀,如出现白色沉淀,可于 55  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min,沉淀即会消失,不影响后续试验;如溶液未变清亮,说明样品消化不彻底,可能导致提取的 DNA 量少而不纯,还有可能导致上柱后堵柱子,可增加消化时间。(4)再加入 200  $\mu\text{L}$  无水乙醇,充分混匀,此时可能会出现絮状沉淀,不影响 DNA 的提取,将溶液和絮状沉淀都加入吸附柱中,放置 2 min。(5)12 000 r/min 离心 1 min,去除废液,将吸附柱放入收集管中。(6)向吸附柱中加入 700  $\mu\text{L}$  漂洗液,12 000 r/min 离心 1 min,去除废液,将吸附柱放入收集管中。(7)向吸附柱中加入 500 mL 漂洗液,12 000 r/min 离心 1 min,去除废液,将吸附柱放入收集管中。(8)12 000 r/min 离心 2 min,将吸附柱置于室温或 50  $^{\circ}\text{C}$  温箱放置数分钟,目的

收稿日期:2015-06-08

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划(编号:2013BAD16B012);青海大学中青年基金(编号:2013-QNT-4)。

作者简介:张宗豪(1982—),男,青海门源人,硕士,助理研究员,主要从事草地微生物研究。E-mail:13897454181@163.com。

通信作者:李玉玲,研究员,主要从事冬虫夏草研究。E-mail:YuLingli2000@163.com。

是将吸附柱中残余的漂洗液去除,否则漂洗液中的乙醇会影响后续试验,比如酶切、PCR 等。(9)将吸附柱放入 1 个干净的离心管中,向吸附膜中央悬空滴加 50 ~ 200  $\mu$ L 经 65  $^{\circ}$ C 水浴预热的洗脱液,室温放置 5 min,12 000 r/min 离心 1 min。(10)离心所得洗脱液再加入吸附柱中,室温放置 2 min,12 000 r/min 离心 2 min,即可得到高质量的基因组 DNA。

1.2.2 ITS rDNA 片段 PCR 扩增 利用真菌通用引物 ITS4/5,以提取的总基因组 DNA 为模板,把 dNTP、buffer、引物、无菌蒸馏水及聚合酶混匀后放入 PCR 仪扩增。初始变性温度为 94  $^{\circ}$ C,退火温度为 40  $^{\circ}$ C,共 35 个循环,获得产物是 ITS4/5 rDNA 片段,经过琼脂糖凝胶电泳纯化后测序。引物<sup>[7]</sup>序列如下:ITS5:5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3';ITS4:5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'。

1.2.3 系统发育树的构建 从 GenBank 核酸序列数据库中下载冬虫夏草及虫草属相关菌株的 ITS 序列(表 1)。2 株

表 1 冬虫夏草及虫草属菌株 ITS 序列 GenBank 登录号

菌种或菌株	学名	GenBank 登录号
冬虫夏草有性型	<i>Cordyceps sinensis</i>	AB067715
		AB067718
		AB067721
		AY725791
		EF378610
		AB067716
冬虫夏草菌	<i>Ophicordyceps sinensis</i>	EU570915
		EU570940
		EU570950
		EU570952
		EU570959
		HM595976
中国被毛孢	<i>Hirsutella sinensis</i>	HM595977
		HM595983
		AJ243979
		AJ243980
		AF033395
		AJ786599
宛氏拟青霉	<i>Paecilomyces variotii</i>	JQ346222
	<i>Tolypocladium inflatum</i>	KF367533
中国弯颈霉	<i>Cephalosporium</i> sp.	HM135170
		EU328187
蝙蝠蛾拟青霉	<i>Paecilomyces hepiali</i>	EF555097
		HE805116
蝙蝠蛾被毛孢	<i>Paecilomyces sinensis</i>	EU272527
		HQ918290
虫草棒束孢	<i>Isaria farinosa</i>	KP027043
绿僵菌	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KJ573520
细脚拟青霉	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	AY037301
明尼苏达被毛孢	<i>Hirsutella minnesotensis</i>	EF194144
砖红镰刀菌	<i>Fusarium lateritium</i>	AF310980
尖头虫草菌	<i>Cordyceps oxycephala</i>	AJ536553
菌株 SH-1	PR_42	
	PR_51	
	PR_61	
	PR_71	
	PR_81	
	PR_91	
	PS_101	
	WR_1	
	WR_2	
	WR_3	
	WR_4	
	WRF_11	
粉红菌株 ZH-1	WRF_12	

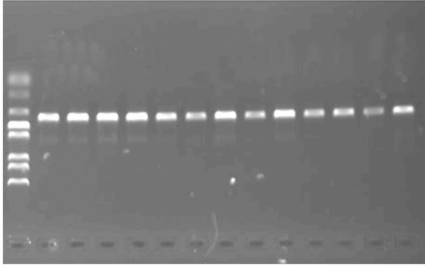
ZH-1、11 株 SH-1 与 32 个从 GenBank 得到的相似序列文件经 ClustalX 2.0 软件掐头去尾编辑后,由 BioEdit 7.0 软件转换为 Fasta 格式,再由 MEGA 6.0 软件进行比对分析并构建系统发育树,并进行 1 000 次 Bootstrap 检验<sup>[8]</sup>。发育树构建方法有邻位相连法(neighbor-joining methods)、最大简约法(maximum parsimony methods)和最大似然法(maximum likelihood methods)<sup>[9-14]</sup>。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增电泳结果

使用真菌 DNA 基因组提取试剂盒提取 2 株粉红菌株 WRF-11、WRF-12 和 11 株 SH-1 菌株的 DNA,其 ITS PCR 产物经凝胶电泳均能扩增出目的条带,条带清晰且稳定,扩增产物大小均在 500 ~ 750 bp 之间(图 1)。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



M—marker; 1—PR\_61; 2—PR\_91; 3—PR\_51; 4—PR\_71; 5—PR\_81; 6—PR\_42; 7—PR\_101; 8—WR\_1; 9—WR\_2; 10—WR\_3; 11—WR\_4; 12—WRF\_11; 13—WRF\_12

图 1 2 株 ZH-1 菌株和 11 株 SH-1 菌株的 ITS PCR 产物电泳结果

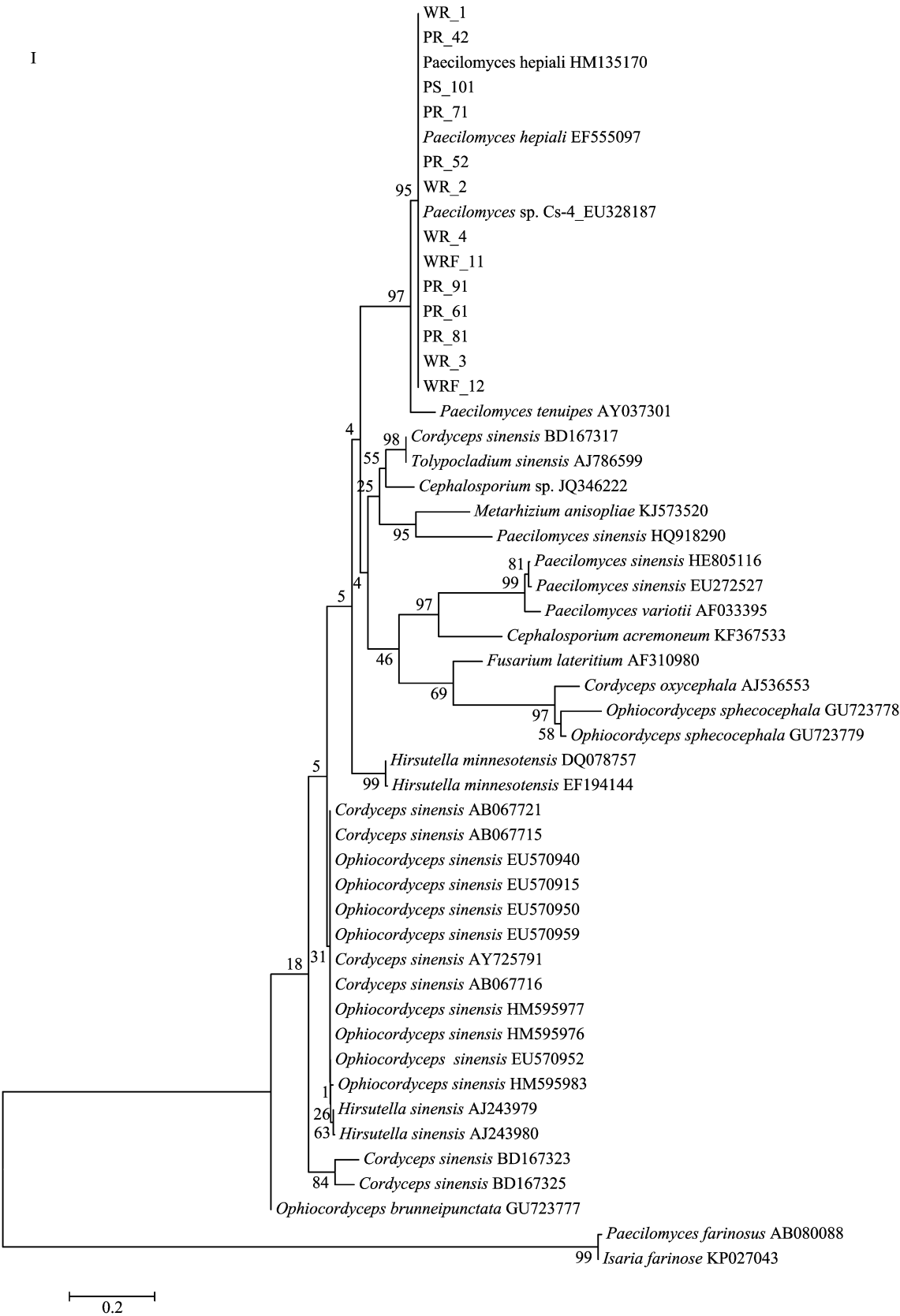
2.2 ITS 序列测序和比对结果

从系统发育树(图 2)和各比对指标确定距离与同源性(表 2 至表 5),可以看出粉红菌株 ZH-1 和菌株 SH-1 在 GenBank 中的相似序列都较多,最具鉴定意义的序列是 *Paecilomyces* sp. Cs-4 (EU328187.1),同源性达到了最高(Blast 中 max ident 都为 100%);与其他蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* (EF555097、AF461743、KF297209)的相似性也在 99%,可以认定菌株 SH-1、粉红菌株 ZH-1 在分类学上与 *Paecilomyces* sp. Cs-4 菌株是同种的,属于拟青霉属真菌蝙蝠蛾拟青霉。

3 讨论

利用分子生物学手段鉴定真菌的类别,首要的前提是样本的保存和提取质量好的真菌 DNA。由于冬虫夏草人工培育阶段的菌株 SH-1 和 ZH-1 有性孢子获取困难,对鉴定是否是同一个种有一定的难度,所以选择比较容易的真菌菌丝提取 DNA。提取过程中发现,在液体培养基中培养 3 周左右,菌丝体 DNA 的产量较高,对后期检测比较有利。

对 2 株 ZH-1 菌株和 11 株 SH-1 菌株的 DNA 分析中发现,虽然 ZH-1 菌株和 SH-1 菌株以及 SH-1 菌株之间在液体培养时形态上有或多或少的差别,但是在分子水平上 13 个菌株的 ITS 保守序列差异极小,可以确定为同一个种。表明真菌存在形态多样性,在特定的环境中,真菌在形态和成分上会发生变化,但在遗传上没有太大变化。那么菌种变化的幅度有多大,需要经过多少时间、传多少代会失去活力变成另



I —邻位相连法，II —最大似然法，III —最大简约法；分支上的数据表示 Bootstrap 检验支持的百分率，种名后为菌株的 GenBank 序列号，标尺参数表示进化距离

图2 11株SH-1菌株和2株ZH-1菌株的系统发育树

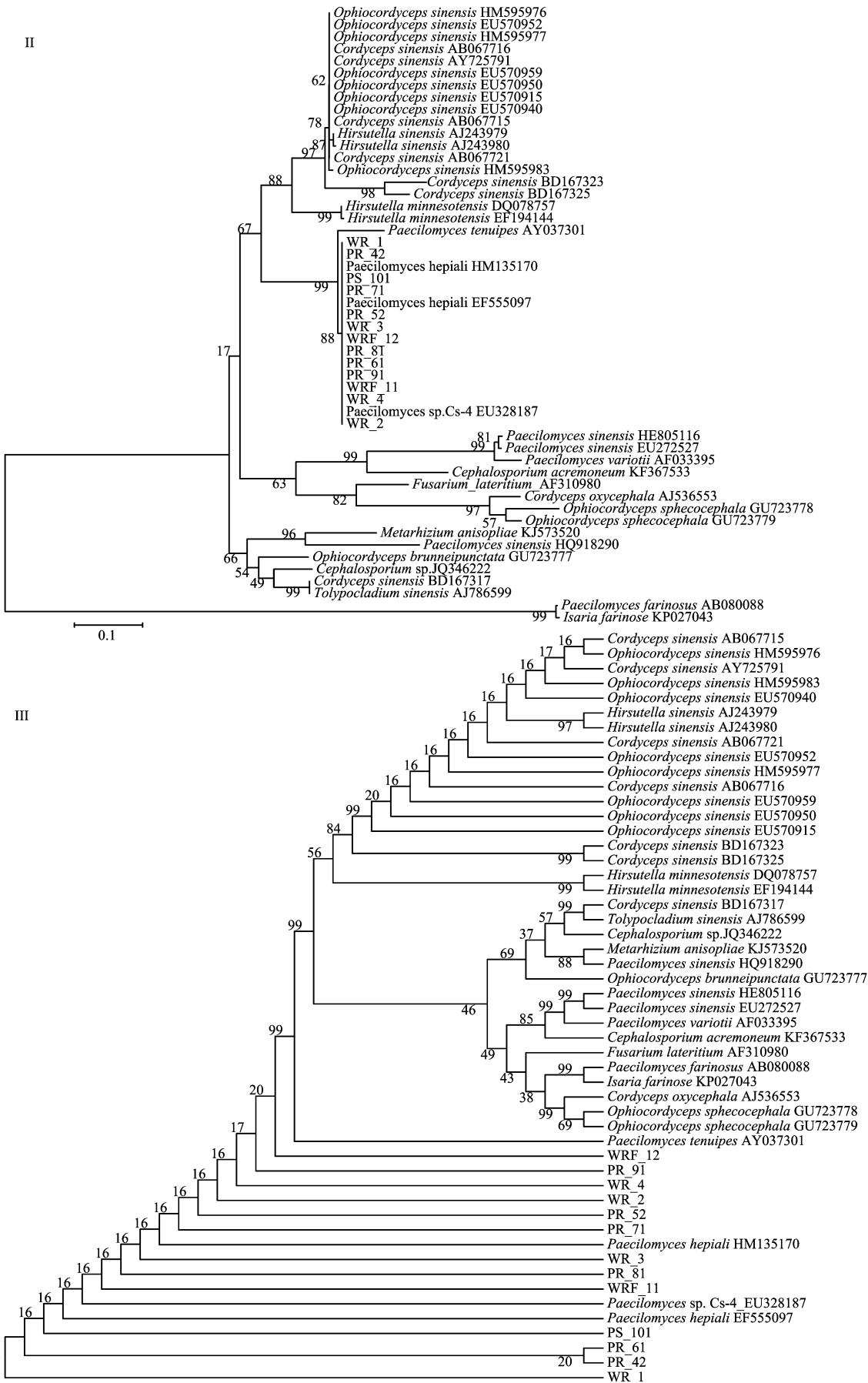


表 2 粉红菌株 WSF\_11 ITS 序列的有意义比对序列

菌种	最大比分	总比分	覆盖度(%)	E 值	相似性(%)	登录号
<i>Paecilomyces</i> sp. Cs - 4	1 086	1 086	100	0.0	100	EU328187.1
<i>Uncultured fungus</i>	1 079	1 079	99	0.0	99	KF297209.1
<i>Paecilomyces hepiali</i>	1 079	1 079	99	0.0	99	EF555097.3
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	1 079	1 079	99	0.0	99	AF461743.1

表 3 粉红菌株 WSF\_12 ITS 序列的有意义比对序列

菌种	最大比分	总比分	覆盖度(%)	E 值	相似性(%)	登录号
<i>Paecilomyces</i> sp. Cs - 4	1 086	1 086	100	0.0	100	EU328187.1
<i>Uncultured fungus</i>	1 077	1 077	99	0.0	99	KF297209.1
<i>Isaria farinosa</i>	1 077	1 077	99	0.0	99	HQ115724.1
<i>Paecilomyces hepiali</i>	1 077	1 077	99	0.0	99	EF555097.3

表 4 菌株 PR\_42 - PR\_91 序列的有意义比对序列

菌种	最大比分	总比分	覆盖度(%)	E 值	相似性(%)	登录号
<i>Paecilomyces</i> sp. Cs - 4	1 086	1 086	100	0.0	100	EU328187.1
<i>Uncultured fungus</i>	1 075	1 075	99	0.0	99	KF297209.1
<i>Fungal</i> sp. APA - 2013	1 075	1 075	99	0.0	99	KF212326.1
<i>Fungal</i> sp. APA - 2013	1 075	1 075	99	0.0	99	KF212325.1
<i>Isaria farinosa</i>	1 075	1 075	99	0.0	99	HQ115724.1

表 5 菌株 WR\_1 - WR\_4 序列的有意义比对序列

菌种	最大比分	总比分	覆盖度(%)	E 值	相似性(%)	登录号
<i>Paecilomyces</i> sp. Cs - 4	1 086	1 086	99	0.0	100	EU328187.1
<i>Uncultured fungus</i>	1 077	1 077	99	0.0	99	KF297209.1
<i>Isaria farinosa</i>	1 077	1 077	99	0.0	99	HQ115724.1
<i>Paecilomyces hepiali</i>	1 077	1 077	99	0.0	99	EF555097.3

外一种形态?是不是菌种形态的变化也是一种生存策略,而不是因为退化老化?是不是存在菌株间的杂交引起的变化,或者是病害引起的变化?这些问题有待进一步研究。

2 种性状的冬虫夏草菌株在同样的培养条件下,生长量是不一样的。前期(5~7 d 内)菌株 SH-1 开始生长,菌丝体附着在瓶壁向内开始延伸,在菌丝体形成的平面中央闭合形成菌盖,并向上、下 2 个面继续生长。中期(7~26 d)一小部分正常菌丝尚未形成闭合状菌盖时,浸入到液体内的菌丝体由白色绒毛状变成透明状,再变为粉红状,这种菌丝体沿着从中心到瓶壁的方向把正常菌丝逐渐变成成为粉红菌丝;一小部分正常菌丝形成菌盖后,由中部某一个点上发生这种变化,但大部分能够正常生长。后期(26~60 d)已转变成粉红色的菌株 ZH-1 在外力破坏其生长环境时,如摇床等,部分可重新转变为菌株 SH-1 生长,而未变化的菌株 SH-1 很少会出现粉红变化。同一种菌的形态转变是否跟环境胁迫有关联、是否与冬虫夏草形成过程中多菌联合侵染有关联,这些问题还有待进一步观察。

参考文献:

[1]梁宗琦. 中国真菌志:第三十二卷 冬虫夏草属[M]. 北京:科学出版社,1991:9-10.

[2]章力建,李 兵,胡育骄. 中国冬虫夏草资源管理概况[J]. 中国草地学报,2010,32(增刊1):1-5.

[3]刘锡铤,郭英兰,俞永信,等. 冬虫夏草菌无性阶段的分离和鉴定[J]. 菌物学报,1989,8(1):35-40.

[4]陈庆涛,肖生荣,施至用. 中国拟青霉新种及其与虫草的关系[J]. 真菌学报,1984,1(1):9-13.

[5]俞永信. 人工培养冬虫夏草研究[J]. 菌物研究,2004(2):42-46.

[6]刘作易. 虫草属及其无性型关系研究[D]. 武汉:华中农业大学,1999:1-180.

[7]朱佳石,郭英兰,姚艺桑,等. 冬虫夏草和中国被毛孢和蝙蝠蛾拟青霉 DNA 共存及竞争增殖力,化学成分变化[J]. 菌物研究,2007,5(4):214-224.

[8]何苏琴,王三喜,罗进仓,等. 冬虫夏草成熟过程中中国被毛孢形态学再研究[J]. 微生物通报,2011,38(11):1730-1738.

[9]Zhu J S, Halpern G M, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: part I [J]. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 1998, 4(3): 289-303.

[10]Chen J,Zhang W,Lu T,et al. Morphological and genetic characterization of a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus and its polysaccharide component possessing antioxidant property in H22 tumor-bearing mice[J]. Life Sciences,2006,78(23):2742-2748.

[11]Xiao W, Yang J L, Zhu P, et al. Non-support of species complex hypothesis of *Cordyceps sinensis* by targeted rDNA-ITS sequence analysis[J]. Mycosystema,2009,28(6):724-730.

[12]Ni L Q, Yao Y S, Gao L, et al. Density-weighted algorithms for similarity computation and cluster tree construction in the RAPD analysis of natural *Cordyceps sinensis*[J]. American Journal of Biomedical Sciences,2014,6(2):82-104.

[13]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[J]. 菌物系统,2000,19(1):60.

[14]Zhang Y J, Li E W, Wang C S, et al. *Ophiocordyceps sinensis*, the flagship fungus of China: terminology, life strategy and ecology[J]. Mycology,2012,3(1):2-10.