


OCLC FirstSearch: Display

Your requested information from your library NEW YORK BOTANICAL GARDEN LIBR



Return

IN PROCESS - Lender

 XC
 H665

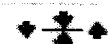
yes 10/11/08



45669683

GENERAL RECORD INFORMATION


Request Identifier: 45669683 **Status:** IN PROCESS 20080910
Request Date: 20080904 **Source:** ILLiad
OCLC Number: 37136413
Borrower: ORE **Need Before:** 20081004
Receive Date: **Renewal Request:**
Due Date: **New Due Date:**
Lenders: VXG, *VXG, COO, COO
Request Type: Copy

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION

 Search the catalog at your library

Call Number:

Title: Jun wu xi tong = Mycosystema /
Imprint: 880-02 Beijing : Ke xue chu ban she, [1997]-2003.
Article: Li Z-Z, Huang B, Fan M-Z.: Molecular evidence for anamorph determination of Cordyceps sinensis (Berk.) Sacc.
Volume: 19
Date: 2000
Pages: 60-64
Verified: <TN:314035> <ODYSSEY:128.193.168.109/ILL> OCLC

BORROWING INFORMATION


Patron: Woolverton, Ryan
Ship To: Library-ILL/Oregon State University/121 The Valley Library/Corvallis, OR 97331-4501
Bill To: same.O005911 ** GWLA MEMBER **
Ship Via: ARIEL: OSU-ILL.library.oregonstate.edu (128.193.162.52)
Electronic Delivery: Odyssey - 128.193.168.109/ILL
Maximum Cost: IFM - \$25.00

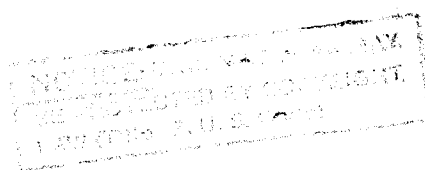
Copyright Compliance: CCL

Billing Notes: BRI usercode 51-0446. FEIN#93-600-1786 --ISI Acct #76636/TGA Acct #61659--CAI ACCT #DD684104--CAS CUSTOMER #1088297-- *****ATTENTION***** NON-USA LIBRARIES, we can not convert to your currency. We can pay via IFLA coupons, IRC coupons, IFM or Visa only. ALL LIBRARIES: Please let us know if you can accept Visa instead of a check for payments. Thanks.

Fax: 541-737-1328

Email: valley.ill@oregonstate.edu

Affiliation: OCLC Western, GWLA (BTP), ORBIS Cascade Alliance



确证冬虫夏草无性型的分子生物学证据*

I. 中国被毛孢与冬虫夏草之间的关系

李增智 黄勃 李春如 樊美珍

(安徽农业大学森林利用学院 合肥 230036)

摘要:从青海的冬虫夏草子实体上分离出中国被毛孢 [*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.], 并利用 RAPD-PCR 技术, 筛选出 8 种引物, 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。

关键词:冬虫夏草, 中国被毛孢, RAPD, 无性型

中图分类号: Q939.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-3515(2000)01-0060-0064

虫草属 [*Cordyceps* (Fr.) Link] 是一大类昆虫病原真菌, 仅清水大典 (1994) 的《原色冬虫夏草图鉴》就已记载 316 种。我国现已记载 70 余种, 其中冬虫夏草由于具有重要的药用价值而最为引人关注。该菌于 1843 年由 Berkeley 根据西藏标本定名为 *Sphaeria sinensis*, 1878 年被 Saccardo 组合进虫草属, 定名为 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.。

近年来, 发酵培养成为热点, 引发了关于冬虫夏草无性型的学术争论。国内迄今已报道与冬虫夏草有关的丝孢菌, 多达 10 属 16 种 (梁佩琼, 1990; 印象初、沈南英, 1990; 梁宗琦, 1991)。

国内关于冬虫夏草无性型的鉴定问题已争论 10 余年。沈南英等 (1983) 率先从虫草子实体上分离出一种丝孢菌, 并在固体培养基上多次形成子座, 其形态与自然状态下长出的子座近似, 该菌被认为是一种头孢霉, (*Cephalosporium* sp.)。陈庆涛等 (1984) 将从采自四川康定的虫草通过组织分离得到的菌株命名为中国拟青霉 (*Paecilomyces sinensis* Chen, Xiao & Shi)。李兆兰等 (1988) 从青海化隆地区的冬虫夏草标本分离出蝙蝠蛾柱霉 (*Scytalidium hepiali* Li), 并发现其有效成分与冬虫夏草接近。同年, 李兆兰又报道了从云南迪庆的冬虫夏草上分离出中国弯颈霉 (*Tolypocladium sinense* Li), 其所含化学成分与天然虫草也很相似。戴如琴等 (1989) 从迪庆白马雪山采集的冬虫夏草僵虫组织上分离得到另一种拟青霉——蝙蝠蛾拟青霉 (*Paecilomyces hepiali* Chen & Dai)。刘锡璠等 (1989) 从四川康定产的冬虫夏草的子座和内菌核上, 通过多批次、大数量、多途径分离获得的菌株, 在菌落和产孢特征上与沈南英等人报道的中国头孢霉基本一致, 他们将此菌定名为中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu & Zeng)。印象初、沈南英 (1990) 认为, 沈南英在青海化隆、玉树等地所分离的菌株是冬虫夏草的无性世代, 该菌在培养基上不仅长出了子座, 而且也长出了子囊壳和子囊孢子, 同天然子囊壳和子囊孢子形态相似; 将虫草菌的天然子

* 基金项目: 安徽省自然科学基金和安徽省教委科学基金共同资助。

收稿日期: 1999-04-09

囊孢子进行单孢萌发培养, 获得了与分离株相同的分生孢子梗和分生孢子。曾被沈南英等称为中国头孢霉的这株丝孢菌被最终正式命名为中华丝束孢 (*Synnematium sinense* Yin & Shen)。梁宗琦(1991)从采自四川理县米亚洛的冬虫夏草内菌核中分离到又一种丝孢菌, 命名为中国金孢霉 (*Chrysosporium sinense* Liang), 其培养性状、生长温度范围, 以及化学成分均与冬虫夏草相似。梁宗琦(1994)认为, 中国被毛孢是冬虫夏草的正确的无性型, 而未合格发表的中国头孢霉和晚发表的中华束丝孢均为其异名。

冬虫夏草的有性型和无性型是它的发育中的不同阶段, 它们的 DNA 是一致的, 形态的不同只是由于 mRNA 的不同表达。本研究拟采用 RAPD 分析来研究冬虫夏草和它的分离物的 DNA 的一致性, 以确证冬虫夏草的无性型。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 冬虫夏草 [*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.]: 采自青海省海东平安县, 寄主昆虫为虫草蝙蝠蛾 (*Hepialus armoricanus* Oberthur)。

1.1.2 培养基: 用 PPDA 培养基 (PDA + 1% 蛋白胨) 分离菌种; 用本研究室筛选的 RCEF11 号固体培养基传代培养。

1.2 方 法

1.2.1 冬虫夏草无性型的分离鉴定: 参照梁宗琦(1985)方法, 选用内菌核和子座组织分离。选择子座饱满、完整的冬虫夏草标本, 经酒精表面消毒后, 用无菌刀片切取子座可孕部及内菌核。分离时注意不要触及虫体肠道及体壁。切取绿豆大小的组织块置于平板培养基上, 并用封口膜封口, 倒置于 17—18℃ 恒温培养箱培养。

1.2.2 DNA 提取 (方法略)

1.2.2.1 *Cordyceps sinensis*: 取一根冬虫夏草子座的可孕部分, 液氮冷冻研磨至粉状, 按朱衡等(1994)采用的程序, 利用氯化苄提取 DNA。

1.2.2.2 *Cordyceps sinensis* 分离物: 利取平板培养物的菌丝, 同上法提取 DNA。

1.2.3 RAPD-PCR 反应: 从加拿大 Sangon 公司的随机引物表中选用 20 个引物。RAPD-PCR 反应体系 (25 μ l) 含有: 2.5 μ l 10xTaq 酶缓冲液 (Sangon 公司), dNTP (Promega 公司) 各 200 μ mol/L, MgCl₂ 1.5mmol/L, 引物 0.12ng, Taq 酶 1.5u (Sangon 公司), 模板 DNA 10ng~1 μ g, 加 30 μ l 石蜡油覆盖。扩增反应在美国 M.J. Research 公司的 Minicycler 上进行: 95℃ 5 分钟, 1 个循环, 94℃ 1 分钟, 36℃ 1 分钟, 72℃ 2 分钟, 40 个循环; 最后 72℃ 2 分钟。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中 (含 EB) 电泳 3 小时。

1.2.4 相似率分析: 根据 Nei 等人(1978)的相似率分析公式进行数据分析:

相似率 = $(2 \times N_{ab}) / (N_a + N_b) 100\%$ (其中, N_{ab} 为菌株 a 和 b 之间共有的 DNA 扩增片段数目, N_a 为个体 a 具有的 DNA 扩增片段数目, N_b 为个体 b 具有的片段数目)。

2 结果与分析

2.1 冬虫夏草分离物的鉴定结果

该分离物的培养特性与刘锡璠等(1989)的描述相近; 经形态鉴定, 进一步确定该虫草分离物为中国被毛孢 (*Hisutella sinensis* Liu, Guo, Yu & Zeng)。其主要特征为: 菌丝体在 PPDA 培养基上生长缓慢。菌落紫褐色, 紧实, 背面褐色。菌丝无色, 分隔, 光滑或具微瘤, 粗 2.2~5.0 μ m。分生孢子梗无色, 单生或簇生于无色球形细胞组成的小子座, 不分

枝至分枝,但不形成孢梗束。瓶梗无色,锥形或钻形,平滑或微具疣,21.6~46.8×3.6~4.0 μm ,平均36.8×3.7 μm 。分生孢子无色,单细胞,光滑,肾形或长椭圆形,5.4~11.2×3.6~4.3 μm ,平均7.1×3.9 μm ;多为2~7个孢子包在一层粘液中而呈柠檬形,9.7×7.6 μm (图1,1~7)。

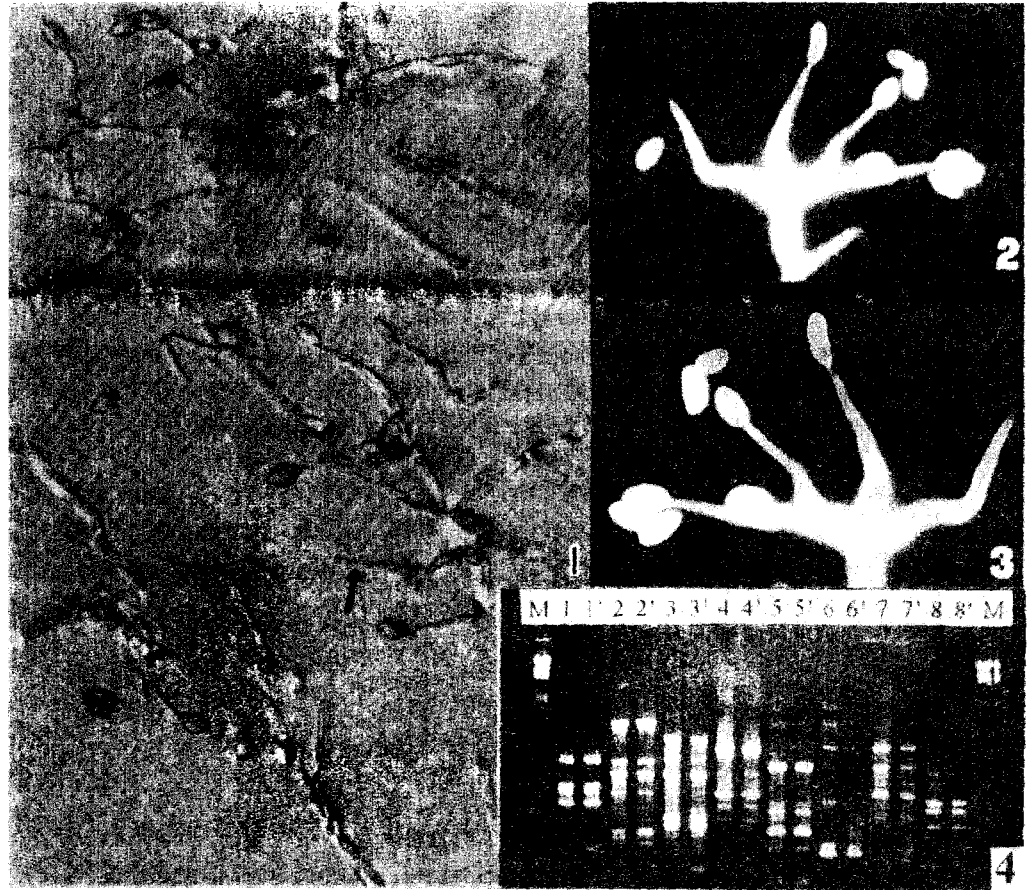


图1 1. 中国被毛孢(*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu & Zong)微干涉显微形态:注意箭头所指的瓶梗颈部具疣,×570; 2~3. 中国被毛孢荧光显微形态(Calcofluor white染色):×1000, 4. 冬虫夏草(*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.)和中国被毛孢(i'-8')的RAPD扩增指纹图谱:1,1'-引物 S_7 ,2,2'-引物 S_{10} ,3,3'-引物 S_{23} ,4,4'-引物 S_{31} ,5,5'-引物 S_{33} ,6,6'-引物 S_{61} ,7,7'-引物 S_{69} ,8,8'-引物 S_{80} ,M: λ DNA/*EcoRI*+*HindIII*分子量标记(21227,5148,4973,4268,3530,2027,1904,1584,1375,947,831,564,125bp)。

2.2 RAPD 分析

所选的20个引物中,有8个(S_7 , S_{10} , S_{23} , S_{31} , S_{33} , S_{61} , S_{69} , S_{80})在以冬虫夏草和中国被毛孢的DNA为模板的反应中,获得了相应的基因组DNA指纹图谱(图1-4)。

8种引物的编号和序列分别是: S_7 GGTGACGCAG, S_{10} CTGCTGGGAC, S_{23} AGT CAGCCAC, S_{31} CAATCGCCTG, S_{33} CAGCACCCAC, S_{61} TTCGAGCCAG, S_{69} CTCACCGTCC, S_{80} ACTTCGCCAC。

两个种的 RAPD 图谱(图 1-4)表明: 在 8 种引物的 DNA 指纹图谱中, 两个种共产生了约 168 条 DNA 片断, 所有片段大小在 2.0kb 以下。其中冬虫夏草 DNA 片段为 85 条, 中国被毛孢为 83 条片断, 两者共有片断 162 条, 相似率为 96%。在 S_{61} 引物条件下, 从扫描图上看, 中国被毛孢比冬虫夏草少了 3 条从 1~2kb 范围的 PCR 的 DNA 片断, 实际上, 在紫外灯下用肉眼可观察到中国被毛孢的这 3 条片断, 只不过片断量少, 谱带较弱, 由于一次性成像仪在扫描过程中分辨率低, 故未能将这 3 条 DNA 片断扫出。

3 讨论

冬虫夏草和中国被毛孢的 DNA 指纹图谱相似率高达 96%, 表明两者的 DNA 是基本一致的。然而在灵敏度极高的 RAPD 反应中, 两种 DNA 间仍然存在 4% 的差异, 这很可能是由于提取 DNA 和分离中国被毛孢所用的不是同一根冬虫夏草的子座的缘故。在同种菌物中, 不同菌株的 RAPD-PCR 相似率范围可在 80%~100% 之间; 在本研究中, 中国被毛孢和冬虫夏草间的 96% 相似率足以证明中国被毛孢是冬虫夏草的无性型。

关于虫草的无性型问题长期以来一直是学术界关注的焦点。确定虫草无性型的最可靠的方法是在实验条件下, 将用各种途径分离获得的假定无性型人工感染寄主昆虫, 诱发形成具有成熟子囊壳的虫草子实体。但由于以下操作的难度, 迄今很少能完成这一程序: ①假定无性型菌株分离、培养的困难; ②寻找原寄主昆虫的困难; ③饲养寄主昆虫的困难; ④感染寄主昆虫的困难; ⑤诱发子座及产生子囊孢子的困难。因此, 以往对有性型-无性型关系的判定主要是根据假定无性型与虫草有性型子实体的相关性进行判断的。

小林义雄(Kobayasi, 1941)在总结前人研究的基础上提出了确定虫草无性型的 5 条标准: ①由虫草子座的一部分或其分枝形成的无性产孢结构; ②在形成虫草子座的菌丝体上形成的无性产孢结构; ③与虫草子座同时出现于同一寄主昆虫体上的无性产孢结构; ④在同一地区, 于产生虫草子座的寄主昆虫的其它虫体上同时观察到的无性产孢结构; ⑤由虫草子座的子囊孢子接种到人工培养基上形成的无性产孢结构。这些标准对目前尚不能人工培养的虫草比较实用, 但无性型的误定常有发生。现在已确定的虫草无性型主要是根据对从弹射的子囊孢子、内菌核及子座组织块分离的丝孢菌的形态鉴定, 此中也不能排除误定的可能。梁宗琦(1991)提出, 根据子囊孢子微循环产孢的方法确定虫草的无性型, 不仅简便、可靠, 且具有很高的实用性; 但不同种的虫草菌次生子囊孢子萌发和微循环产孢的条件各不相同, 因此在只获得少量子囊孢子的情况下未必能实现微循环产孢的操作。

本研究结果证明, 应用 RAPD-PCR 的分子生物学的方法可以为确定虫草的无性型提供可靠的分子生物学证据, 其程序是首先分别提取虫草子座和假定无性型的 DNA, 再筛选出合适的引物进行 PCR 扩增, 得到相应的基因组 DNA 指纹图谱; 如果两者的指纹图谱相似率很高(在 90% 以上), 就可确定分离获得的假定无性型是实际的无性型。此外, 用保守的引物 ITS1, ITS4 对 rDNA 的 ITS 区域进行 PCR 扩增, 产物经纯化后, 对 ITS 进行测序, 比较两者碱基序列的相似性, 也可确定虫草的无性型。

为了进一步确证冬虫夏草的无性型, 本研究还做了冬虫夏草、中国被毛孢和其他分离自冬虫夏草的假定无性型菌株 [涉及到中国拟青霉(*Paecilomyces sinensis* Chen, Xiao & Shi)、中国金孢霉(*Chrysosporium sinense* Liang) 和虫生簇孢(*Sporothrix insectorum*

de Hong & Evans)的平行测定,结果表明他们的 DNA 指纹图谱相似性很低,从而排除了他们作为冬虫夏草无性型的可能性(另文发表)。

【参 考 文 献】

- 印象初、沈南英,1990. 冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 的无性世代—中华束丝孢 *Symmetium sinensis* Yin et Shen sp. nov.. 高原生物学季刊,第9集. 北京:科学出版社,1~5页。
- 刘锡进、郭英兰、余永信等,1989. 冬虫夏草无性阶段的分离和鉴定,真菌学报,8(1):35~40。
- 沈南英、曾璐、张显耻,1983. 冬虫夏草菌的分离. 食用菌(5):1~3。
- 李光兰、孙云汉,1988. 柱霉属一新种——蝙蝠蛾柱霉,真菌学报,7(1):23~28。
- 李兆兰,1988. 中国弯颈霉新种及产环孢菌素的研究,真菌学报7(2):93~98。
- 李增智、黄勃、樊美珍等,1998. 利用 RAPD-PCR检测三种白僵菌及球孢白僵菌种内变异,菌物系统,17(2):185~189。
- 陈庆涛、肖生荣、施至用,1984. 中国拟青霉新种及其与虫草的关系,真菌学报,3(2):109~112。
- 梁宗琦,1985. 古尼虫草分生孢子阶段的分离鉴定,真菌学报,4(3):162~166。
- 梁宗琦,1991. 一个分离自冬虫夏草的金孢霉新种,真菌学报,10(1):50~56。
- 梁宗琦,1991. 虫草的无性型及其确定. 西南农学报,4(4):1~8。
- 梁宗琦,1994. 虫草及其人工培养. 贵州农学院丛刊,增刊(26):1~21。
- 戴如琴、兰江丽、陈伟华等,1989. 蝙蝠蛾拟青霉新种的研究,北京农业大学学报,15(2):221~225。
- 小林义雄,清水大典,1983. 冬虫夏草菌图谱. 大阪:保育社. 163~165。
- 清水大典,1994. 原色冬虫夏草图鉴. 东京都:诚文堂新光社. 208~209。
- Kobayasi Y, 1941. The genus *Cordyceps* and its alies. *Sci Rep Tokyo Bunrika Daigaku*, 5(84):204~207.
- Nei M *et al.* 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:5264.

MOLECULAR EVIDENCE FOR ANAMORPH DETERMINATION OF *CORDYCEPS SINENSIS* (BERK.) SACC.

I. Relation Between *Hirsutella sinensis* and *C. sinensis*

Li Zeng-Zhi Huang Bo Fan Mei-Zhen

(College of Forest Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

ABSTRACT: A strain of *Hirsutella sinensis* Liu *et al.* was isolated from a cadaver of *Hepialus armoricanus* Oberth. infected by *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. RAPD-PCR techniques were used to study the relationship between *H. sinensis* and *C. sinensis*. Twenty random primers were screened and genomic DNA spectra of *C. sinensis* and *H. sinensis* were obtained with 8 primers, with the similarity between the 2 species at 96%, confirming that *H. sinensis* is the anamorph of *C. sinensis*.

KEY WORDS: *Cordyceps sinensis*, *Hirsutella sinensis*, RAPD, Anamorph