

不同地域的冬虫夏草 rDNA ITS 区的序列分析和遗传分化

汪家春¹,徐 军²,李兆兰^{3*},王 玥⁴,陈雅琳¹¹中国人民解放军海军医学研究所,上海 200433;²上海健康医学院,上海 200093;³南京大学生命科学学院,南京 210093;⁴新疆大学生命科学与技术学院,乌鲁木齐 830046

摘要:了解不同地区的冬虫夏草种内的遗传分化及变异情况,进行 18S rDNA ITS 区的序列分析,以期为它们的差别建立分子标记,也为不同地区来源的商品冬虫夏草的鉴定提供分子依据。冬虫夏草样品应用 DNA 提取试剂盒所提供的方法(CTAB 法)提取基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度,DNA 经 PCR 扩增,PCR 扩增产物在 DNA 全自动测序仪上进行序列测定。测序结果获得 6 个不同地域的冬虫夏草 18S rDNA ITS 区基因序列图谱和 GC 含量(%)。实验结果表明,6 个不同地区的冬虫夏草基因序列,反映了冬虫夏草种内的遗传分化和变异,其遗传分化与变异的程度与海拔高度和纬度呈正相关性,这些分化可应用于不同地区冬虫夏草的鉴定。

关键词:冬虫夏草;rDNA ITS;PCR 扩增;遗传分化和变异;海拔高度和纬度

中图分类号:R282.5;Q939.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.11.019

Analyses and Genetic Variation of rDNA ITS in *Ophiocordyceps sinensis* from Different Geographical Regions

WANG Jia-chun¹, XU Jun², LI Zhao-lan^{3*}, WANG Yue⁴, CHEN Ya-lin¹¹PLA Navy Medical research institute, Shanghai 200433, China;²Shanghai Health Medical College, Shanghai 200093, China;³College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China;⁴College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Wulumuqi, 830046, China

Abstract: To investigate the genetic variation among *Ophiocordyceps sinensis* from different geographical regions, the sequence of 18S rDNA ITS was analysed in *Ophiocordyceps sinensis*, in order to establish the molecular genetic marker for *O. sinensis* from different geographical regions. Total DNA of dry specimens was extracted from stroma or sclerotium powder of *O. sinensis* using a modification of the DNA isolations protocol of Lee&Taylor (1990). The crude extracts were examined by 1% agarose gel electrophoresis in 1 × TAE buffer. The extracts were used as templates and were amplified with PCR technology, PCR amplification products were purified, sequenced and compared. The present study showed that sequences of 18S rDNA ITS there were obvious genetic variations and dissimilarity among in *O. sinensis* from different geographical regions, such as, sequences composition, GC content (%) etc. The results showed that genetic differentiation of *O. sinensis* has close relation to latitudes and elevation highness. These differences can be used to differentiate locality identification of *O. sinensis*.

Key words: *Ophiocordyceps sinensis*; rDNA ITS; PCR amplification; genetic differentiation; elevation highness and latitudes

对于不同地区冬虫夏草的遗传分化及多样性的研究,主要采用分子生物学遗传标记方法探讨,开始阶段主要应用 RAPD 方法^[1-4],还有使用 ISSR 方

法^[5],另有研究人员采用 SSR 方法作为分子标记进行研究^[6]。近年来核糖体 DNA ITS 序列技术因其简单、快速、灵敏、准确而得到广泛应用,是一种新的遗传标记,已成为真菌分子生物学研究中的热点,为研究真菌系统发育最为有效的方法之一^[7],在研究和鉴定虫草有性型和无性型对应关系上取得很好发展^[8],在冬虫夏草种级水平分类鉴定,种内不同地

收稿日期:2018-04-25 接受日期:2018-09-28

基金项目:解放军总后勤部科研项目(11DJ22b);全军医学科技青年培训项目(13QP072);上海教育委员会科研创新项目(11YZ293)

* 通信作者 E-mail:Xujiejie2@hotmail.com

理菌株的鉴定上是重要分子指标^[9-12]。

本实验应用 18S rDNA ITS 区序列作为分子遗传标记,能有效鉴别冬虫夏草菌的种内遗传分化和变异,证实冬虫夏草菌存在明显的地域性以及遗传多样性,以期为不同产地来源的冬虫夏草的鉴定提供分子指证。

1 材料与方 法

1.1 冬虫夏草标本采集

上海海军医学研究所所在冬虫夏草生长季节于 5 ~ 6 月派研究人员赴高原地区采集新鲜冬虫夏草,采集地点为:青海玉树、西藏那曲、西藏林芝、四川理塘、甘肃甘南、尼泊尔等地。将采集到的新鲜冬虫夏草装在有冰袋的低温容器中,航空邮寄至实验室,冰箱 4 ℃ 保存,备用。每个地区采集的样本量为 20 ~ 30 根,所采集的冬虫夏草标本经南京大学生命科学院真菌学专家李兆兰教授鉴定为冬虫夏草 (*Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G. H. Sung),具有冬虫夏草种的鉴定的准确性和冬虫夏草标本来源地区的代表性。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂

DNA 提取试剂:DNA 微量提取试剂盒(北京天根生物化学技术有限公司),试剂:CTAB(十六烷基三甲基溴化铵);EDTA(乙二胺四乙酸);Tris(三羟基甲基氨基甲烷);巯基乙醇,氯仿,异戊醇,异丙醇,乙醇均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。PCR 扩增试剂:Ex Taq 酶(DNA 聚合酶)(TaKaRa 公司,日本);dNTP(TaKaRa 公司,日本)。引物:ITS1, ITS4 (Invitrogen 上海英骏生物技术公司);电泳检测试剂:1% 琼脂糖凝胶,溴酚蓝,溴化乙锭(EB),TAE 电泳缓冲液(上海百灵威化学技术有限公司)。Marker:DL2000bp (DNA 分子量标准品)(北京康润生物科技有限公司)。

1.2.2 主要仪器

高速低温离心机(美国,Beckman);PCR 扩增仪(美国,Eppendorf 9700);琼脂糖水平电泳仪(北京六一仪器厂,Dycp-32A 型);测序仪(美国,ABI 3730XL);紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司,UV-9100)(上海精密科学仪器有限公司,UV-759)

1.3 DNA 的提取-采用改进的 CTAB 法提取 DNA

冬虫夏草标本 10 mg 放入研钵中加入液氮快速研磨成粉末状,在装有冬虫夏草粉末的离心管中加

入 700 μ L 已预热至 65 ℃ 和含有巯基乙醇的 CTAB 提取液,将离心管放入 65 ℃ 水浴锅中恒温 2 h。在水浴过程中颠倒离心管混摇数次,以使样品充分混合。加入 1% 的 3 mol/L 乙酸钠(NaAc)混匀,取出离心管冷却至室温后,12 000 rpm 离心 10 min,移上清液至新的离心管中。加入等体积的 Tris-/饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1 v/v)脱蛋白,先将氯仿与异戊醇按 24:1 v/v 混合,再与 Tris-/饱和酚(pH8.0)等体积混合,充分颠倒混匀,12 000 rpm 离心 10 min,用微量移液器小心吸取上清液移至新的离心管中,(氯仿-异戊醇脱蛋白步骤可重复 1 ~ 2 次),吸取上清液转入吸附柱中(是一种特异性结合 DNA 的离心吸附柱,该柱采用硅基质材料,高效专一吸附 DNA,可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其它有机化合物,提取的基因组 DNA 片段大,纯度高,质量稳定可靠),12 000 rpm 离心 30 s,弃掉废液。向吸附柱中加入无水乙醇以沉淀 DNA,加入 500 μ L 缓冲液清洗沉淀,12 000 rpm 离心 30 s,倒掉废液,加入 75% 乙醇清洗沉淀,离心,倒弃废液,将吸附柱置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附柱中残余的清洗液。向柱的吸附膜的中间部位悬空滴加 50 ~ 200 μ L 洗脱缓冲液 TE 或无菌的重蒸馏水(pH < 7.0)溶解 DNA 沉淀,4 ℃ 过夜,使 DNA 充分溶解,置于-20 ℃ 保存,以防 DNA 降解^[13-16]。

1.4 基因组 DNA 的电泳检测

取 10 μ L 的 DNA 样品溶液与 2.0 μ L 溴酚蓝溶液混合均匀,点入到 1% 琼脂糖凝胶中,用 1 \times TAE 缓冲液在电压 5 V/cm 下电泳 30 min,电泳条带在紫外分析仪上检测,DNA 标准品分子量为 2 000 bp,用作对照和标记。

1.5 PCR 扩增反应

1.5.1 引物设计:ITS 序列扩增引物为 ITS-1,ITS-4。

ITS-1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS-4 5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3'

1.5.2 PCR 扩增反应体系(20 μ L):10 \times Ex Taq buffer 2.0 μ L,2.5 mmol/L dNTP Mix 1.6 μ L,5P Primer 1 0.8 μ L,5P primer 2 0.8 μ L,Template(模板,DNA 提取液)0.5 μ L,5u Ex Taq 0.2 μ L,ddH₂O 14.1 μ L,总体积 20 μ L。

1.5.3 PCR 扩增反应条件

95 ℃ 预变性 5 min;24 个循环(95 ℃ 变性 0.5 min,55 ℃ 退火 0.5 min,72 ℃ 延伸 1 min);最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.6 PCR 扩增产物的电泳检测

吸取 4~5 μL 的扩增产物用于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,1 \times TAE 缓冲液,电压 75 V/cm,电泳 2 h,溴化乙锭(EB)染色,在紫外灯下显现照相。

1.7 扩增产物的纯化

电泳的条带从凝胶上切割下来,用 PCR 纯化试剂盒所提供的方法进行纯化和回收(Tiagen Beijing)。

1.8 基因测序

纯化后的 PCR 扩增产物在 DNA 全自动测序仪(ABI 3730XL)上直接序列测定。所测序列为 18S rDNA ITS 序列,碱基总长为 555~560 个碱基(bp)。

1.9 数据分析

应用 NCBI(国际中心生物技术情报 National Center of Biotechnology Information)的 Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)和 DNAMAN 序列分析软件进行序列一致性分析,从 GenBank 中下载与研究菌株相似性较高的 ITS 序列进行比对,通过邻接法(Neighbour-Joining, NJ)构建分子系统发育树,经重复取样 1000 次进行自展值(Bootstrap)分析,自展值确证 50 或超过 50。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 纯度的电泳检测

电泳图谱显示(图 1、图 2),条带清晰,完整明亮,无弥散滞和拖尾现象,纯度较高,可用于 PCR 扩增。

2.2 不同地域的冬虫夏草 rDNA ITS 区基因组序列组成

表 1 不同地区的冬虫夏草基因序列组成

Table 1 Composition of 18S rDNA ITS of *O. sinensis* from 6 different geographical regions

地区 Region 碱基数目 Base number	A 腺嘌呤 Adenine	G 鸟嘌呤 Guanine	C 胞嘧啶 Cytosine	T 胸腺嘧啶 Thymine	碱基总长 Total length (bp)	GC 长度 GC length (bp)	GC 含量 GC count (%)
青海玉树 Qinghai Tamaki	120	151	199	85	555	350	63.06
西藏那曲 Tibet Nagqu	119	152	199	85	555	351	63.06
西藏林芝 Tibet Linzhi	124	150	197	86	557	347	62.30
四川理塘 Sichuan Litang	123	153	196	87	559	349	62.43
甘肃甘南 Gansu Gannan	123	151	198	86	558	349	62.54
尼泊尔 Nepal	124	151	198	87	560	349	62.32

注:碱基(bp)。

2.3 不同地区冬虫夏草碱基变异的数目及变异率

在不同地区的冬虫夏草的碱基序列位点上有些碱基发生变异(表 2,续表 2,续表 3,续表 4),青海玉

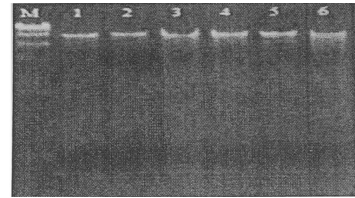


图 1 6 个地区冬虫夏草的 DNA 提取电泳图

Fig. 1 DNA electrophoretogram of *O. sinensis* from 6 different geographical regions

M: DL2000bp Marker.

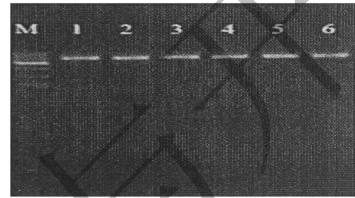


图 2 6 个地区冬虫夏草 18S rDNA PCR 扩增电泳图

Fig. 2 PCR amplification products electrophoretogram of *O. sinensis* from 6 different geographical regions

6 个不同地区的冬虫夏草基因序列的碱基(A、G、C、T)组成的数目,长度和含量都有明显分化和变异,没有完全相同的,但是分化和变异的程度随不同的地区而不同(表 1)。青海玉树和西藏那曲冬虫夏草碱基序列的组成差异较小,四川理塘、甘肃甘南与尼泊尔冬虫夏草之间的碱基分化和变异也较小。西藏林芝与其它所有地区的碱基数、碱基长度和含量基本都不相同,分化和变异较大。四川理塘、甘肃甘南、尼泊尔与青海玉树、西藏那曲冬虫夏草的碱基序列组成也完全不相同,差异也较大。

树与西藏林芝冬虫夏草 ITS 序列的 555 个碱基中有 7 个位点上的碱基不同,如:ITS 序列 34 位点上的碱基青海玉树为胞嘧啶(C),西藏林芝为胸腺嘧啶

(T), 467 位点上青海玉树为鸟嘌呤(G), 西藏林芝为腺嘌呤(A)。青海玉树与四川理塘冬虫夏草的 ITS 序列上有 6 个位点上的碱基不同, 青海玉树与甘肃甘南、尼泊尔分别有 7 个位点和 4 个位点上的碱基不同(表 2)。西藏那曲与西藏林芝、四川理塘冬虫夏草的 ITS 序列上分别有 8 个位点、7 个位点上的碱基不同, 西藏那曲与甘肃甘南、尼泊尔分别有 8 个位点、5 个位点上的碱基不同(续表 2)。西藏林芝与四川理塘冬虫夏草 ITS 序列中有 4 个位点上的

碱基不同, 西藏林芝与甘肃甘南、尼泊尔分别有 6 个位点、5 个位点上的碱基不同(续表 3)。四川理塘与甘肃甘南、尼泊尔冬虫夏草 ITS 序列中分别有 2 个位点、1 个位点上的碱基不同, 青海玉树与西藏那曲 ITS 序列的 186 位点上有 1 个碱基不同, 甘肃甘南与尼泊尔冬虫夏草 ITS 序列的 393 位点上有 1 个碱基不同(续表 4)。ITS 序列上不同碱基数目的多寡, 提示冬虫夏草种内遗传分化大小和变异程度情况。

表 2 不同地区冬虫夏草 ITS 序列位点上的不同碱基的比对

Table 2 Base compare of ITS sequences site in different geographical region of *O. sinensis*

ITS 序列位点 ITS sequence site	青海玉树 Qinghai Tamaki	西藏林芝 Tibet Linzhi	ITS 序列位点 ITS sequence site	青海玉树 Qinghai Tamaki	四川理塘 Sichuan Litang	ITS 序列位点 ITS sequence site	青海玉树 Qinghai Tamaki	甘肃甘南 Gansu Gannan	ITS 序列位点 ITS sequence site	青海玉树 Qinghai Tamaki	尼泊尔 Nepal
34	C	T	24	C	T	34	C	T	34	C	T
112	C	A	448	G	A	393	T	C	467	G	A
409	C	A	450	T	C	467	G	A	469	T	C
467	G	A	467	G	A	469	T	C	486	G	A
486	G	A	475	A	G	486	G	A			
495	G	C	501	A	G	520	A	G			
520	A	G				523	C	T			
不同碱基数目 Number of different base		7			6			7		4	
变异率(%) Variation rate		1.26			1.08			1.26		0.73	

注: A(腺嘌呤); G(鸟嘌呤); C(胞嘧啶); T(胸腺嘧啶)。

Note: A(adenine); G(guanine); C(cytosine); T(thymine).

续表 2 不同地区冬虫夏草 ITS 序列位点上的不同碱基的比对

Continued table 2 base compare of ITS sequences site in different geographical region of *O. sinensis*

ITS 序列位点 ITS sequence site	西藏那曲 Tibet Nagqu	西藏林芝 Tibet Linzhi	ITS 序列位点 ITS sequence site	西藏那曲 Tibet Nagqu	四川理塘 Sichuan Litang	ITS 序列位点 ITS sequence site	西藏那曲 Tibet Nagqu	甘肃甘南 Gansu Gannan	ITS 序列位点 ITS sequence site	西藏那曲 Tibet Nagqu	尼泊尔 Nepal
34	C	T	24	C	T	34	C	T	34	C	T
112	C	A	168	G	A	186	G	A	186	G	A
186	G	A	448	G	A	393	T	C	469	T	C
409	C	A	450	T	C	466	G	A	520	A	G
467	G	A	467	G	A	469	T	C	523	C	T
486	G	A	475	A	G	486	G	A			
495	G	C	501	A	G	520	A	G			
520	A	G				523	C	T			
不同碱基数目 Number of different base		8			7			8		5	
变异率(%) Variation rate		1.44			1.26			1.44		0.90	

续表 3 不同地区冬虫夏草 ITS 序列位点上的不同碱基的比对

Continued table 3 base compare of ITS sequences site in different geographical region of *O. sinensis*

ITS 序列位点 ITS sequence site	西藏林芝 Tibet Linzhi	四川理塘 Sichuan Litang	ITS 序列位点 ITS sequence site	西藏林芝 Tibet Linzhi	甘肃甘南 Gansu Gannan	ITS 序列位点 ITS sequence site	西藏林芝 Tibet Linzhi	尼泊尔 Nepal
391	A	C	112	A	C	112	A	C
475	A	G	393	T	C	409	A	C
476	C	G	409	A	C	469	T	C
504	C	T	469	T	C	495	C	G
			495	C	G	523	C	T
			523	C	T			
不同碱基数目 Number of different base		4		6			5	
变异率(%) Variation rate		0.73		1.08			0.90	

续表 4 不同地区冬虫夏草 ITS 序列位点上的不同碱基的比对

Continued table 4 base compare of ITS sequences site in different geographical region of *O. sinensis*

ITS 序列位点 ITS sequence site	青海玉树 Qinghai Tamaki	西藏那曲 Tibet Nagqu	ITS 序列位点 ITS sequence site	四川理塘 Sichuan Litang	甘肃甘南 Gansu Gannan	ITS 序列位点 ITS sequence site	四川理塘 Sichuan Litang	尼泊尔 Nepal	ITS 序列位点 ITS sequence site	甘肃甘南 Gansu Gannan	尼泊尔 Nepal
186	A	G	375	T	C	475	G	A	393	C	T
			475	G	A						
不同碱基数目 Number of different base		1		2			1			1	
变异率(%) Variation rate		0.18		0.36			0.179			0.178	

2.4 不同地区冬虫夏草基因序列变异的遗传距离^[17]

6 个不同地区的冬虫夏草遗传距离(DNA_{dist})分析表明(表 3);距离值范围为 0.001 8~0.014 4,遗传距离值小,遗传分化小,遗传距离值大遗传分化大。青海玉树与西藏那曲不在同一省内,二地冬虫夏草距离值却较小,为 0.001 8,西藏林芝与西藏那曲冬虫夏草位于同一省内,二地冬虫夏草距离值却较大为 0.014 4。甘肃甘南与四川理塘、尼泊尔也不在同一省内,三地冬虫夏草之间的距离值也较小,分别为 0.003 6、0.001 8、0.001 8。这主要与采集到的冬虫夏草的当地气候条件有关,海拔高温度低,纬度高温度低。青海玉树与西藏那曲的海拔高度在 4 500 m 以上,纬度在 36°,而西藏林芝的海拔高度为 3 000 m,纬度 29°,西藏林芝温度远高于玉树与那

曲。另外从甘南、理塘、尼泊尔采集的冬虫夏草生长地区的海拔高度在 3 400~3 600 m,纬度 30~33°,高于西藏林芝,低于青海玉树与西藏那曲的海拔高度与纬度,所以甘南、理塘、尼泊尔与林芝、玉树、那曲的遗传距离值有明显差异。

2.5 不同地区冬虫夏草基因序列同源性

六个不同地区的冬虫夏草基因序列虽然存在遗传分化和变异,但是也存在了种的同源性(表 4),西藏林芝、甘肃甘南与西藏那曲、青海玉树的碱基变异分化虽然较大,但是冬虫夏草种的相似率分别为 98.56%、98.74%。其他几个地区基因序列的相似率最高为 99.82%,最低为 98.56%。核糖体 DNA ITS 的序列分析虽然表达了种的遗传分化和变异,但是没有超出种的分化水平,而且反映了种的高度同源性^[18],和种的特异性^[19],仍属于冬虫夏草

表3 不同地区冬虫夏草的遗传距离

Table 3 Genetic distance values(D) among 6 *O. sinensis* from different geographical regions

地区 Region 遗传距离 Genetic distance	青海玉树 Qinghai Tamaki	西藏那曲 Tibet Nagqu	西藏林芝 Tibet Linzhi	四川理塘 Sichuan Litang	甘肃甘南 Gansu Gannan
青海玉树 Qinghai Tamaki	-	-	-	-	-
西藏那曲 Tibet Nagqu	0.001 8	-	-	-	-
西藏林芝 Tibet Linzhi	0.012 6	0.014 4	-	-	-
四川理塘 Sichuan Litang	0.010 8	0.012 6	0.007 3	-	-
甘肃甘南 Gansu Gannan	0.012 6	0.014 4	0.010 8	0.003 6	-
尼泊尔 Nepal	0.007 3	0.009 0	0.009 0	0.001 8	0.001 8

Ophiocordyceps sinensis 种的范围,如同源性小于 96.0%那就是虫草属的不同种。

表4 不同地区冬虫夏草序列的相似率(%)

Table 4 Similar rate of 18S rDNA ITS of *O. sinensis* from 6 different geographical regions(%)

地区 Region 相似率 Similar rate (%)	青海玉树 Qinghai Tamaki	西藏那曲 Tibet Nagqu	西藏林芝 Tibet Linzhi	四川理塘 Sichuan Litang	甘肃甘南 Gansu Gannan
青海玉树 Qinghai Tamaki	-	-	-	-	-
西藏那曲 Tibet Nagqu	99.82	-	-	-	-
西藏林芝 Tibet Linzhi	98.74	98.56	-	-	-
四川理塘 Sichuan Litang	98.93	98.73	99.28	-	-
甘肃甘南 Gansu Gannan	98.74	98.56	98.92	99.64	-
尼泊尔 Nepal	99.72	99.10	99.10	99.82	99.82

2.6 不同地区冬虫夏草的 GC 含量与环境因素

青海玉树与西藏那曲的海拔高度与纬度较高属于典型的高原严寒气候,二地的海拔高度与纬度相近,所以二地区冬虫夏草序列 GC 含量相同。西藏林芝的海拔高度和纬度都低于那曲和玉树,在西藏林芝地区全年温和湿润、山清水秀、景色宜人、绿色盎然,素有西藏的江南之称,所以林芝地区与那曲、玉树在序列组成,GC 含量(%)及 GC 长度(bp)都有差别。甘肃甘南、尼泊尔、四川理塘其海拔高度和纬度相接近,GC 长度相同,GC 含量相近。实验结

果还表明(表5)高海拔和高纬度地区生长的冬虫夏草序列的 GC 含量(%)要高于低海拔和低纬度地区的 GC 含量(%),这与有关科研单位研究的结论相一致^[19]。研究结果表明基因序列特征与海拔高度和纬度呈正相关性。真菌中都有固定的 GC% 含量,其变化较保守,GC% 含量差别越大,生物之间的亲缘关系越远,GC% 含量差别越小,亲缘关系越近,GC% 含量差别在 5% 之内则认为是同一种,差别在 10% -15% 之间是同属不同种,差别大于 20% 则是不同属。

表5 6 个地区冬虫夏草的 GC 长度(bp)及 GC 含量(%)与海拔高度、纬度及经度

Table 5 Altitudes, latitudes, longitudes and GC length, GC content of rDNA ITS in 6 populations of *O. sinensis*

地区 Region GC (%)	GC 长度 GC length (bp)	GC 含量 GC content (%)	海拔高度 Altitude (m)	纬度 Latitude	经度 Longitude
青海玉树 Qinghai Tamaki	350	63.06	4 500	36.35	96.60
西藏那曲 Tibet Nagqu	351	63.06	4 505	36.53	92.05
西藏林芝 Tibet Linzhi	347	62.30	2 994	29.58	94.34
四川理塘 Sichuan Litang	349	62.43	3 600	30.43	100.27
甘肃甘南 Gansu Gannan	349	62.54	3 400	33.06	100.40
尼泊尔 Nepal	349	62.32	3 500	32.51	92.09

2.7 不同地区冬虫夏草基于序列特征构建的系统发育树

通过邻接法(NJ)对六个地区的冬虫夏草的遗传关系构建分子系统树,采用重复抽样 1000 次检验系统树各分支的自展值(Bootstrap)。青海玉树与西藏那曲冬虫夏草序列相近为一居群,甘肃甘南、尼泊尔、四川理塘的冬虫夏草遗传关系相近为另一居群,西藏林芝冬虫夏草与前两个居群都有明显差异,所以单独为一个分支居群(图 3)。rDNA ITS 作为有效的遗传标记,可应用于在分子水平上研究冬虫夏草种内地理菌株之间的遗传分化和变异。



图 3 基于 ITS 构建的系统发育树

Fig. 3 Molecular phylogenetic tree using ITS data

3 讨论

3.1 DNA 的提取

改良的 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法提取 DNA 有很多优点,所提取的基因组 DNA 的质量和纯度较高,加入液氮对原材料进行充分研磨和粉碎,可以抑制 DNase 酶的活性,以防止 DNA 的降解。在 CTAB 法中加入巯基乙醇,提供了还原作用的巯基(抗氧化剂)以防止提取中所产生的次生产物的氧化,避免了 DNA 的褐变。采用 Tris/饱和酚-氯仿-异戊醇相结合的提取方法,能有效的去除提取液中的蛋白质和多酚类的物质。在提取液中加入 3 mol/L NaAc 能溶解和去除多糖以及脂溶性的色素,提高 DNA 的纯度^[4]。

3.2 海拔高度和纬度对冬虫夏草遗传分化和变异的影响

经度指示东西方向差异,而东西方向得到的太阳辐射差别不大,所以不直接影响气候。在生态自然环境中,海拔高度与纬度对气候有很大的影响。就纬度来说纬度越高地面接受的热量较少,气候寒冷,纬度越低,地面接受的热量较多,气候炎热,温度

高,所以高纬度地区为寒带,中纬度地区为温带,低纬度地区为热带,纬度的高低也标志着不同地区的气候冷热情况。海拔高度是影响气候的重要因素,海拔高度与气温有密切关系,海拔越高气温越低,因为对流层大气的直接热源是地面,离地面越远,得到的地面辐射越少,气温也就越低,每上升 1 000 m,气温就下降 6 ℃(气温垂直递减率)。西藏林芝海拔为 3 000 m,夏季气温 20 ℃。西藏那曲高原海拔 4 500 m,夏季时气温为 11 ℃,比林芝低 9 ℃。多篇文章研究表明^[4,5,18,20],冬虫夏草菌的种内遗传分化具有地域性和多样性,种内的遗传分化小于种间的遗传分化,而且与纬度有密切关系,不同地域的冬虫夏草菌株间的遗传分化要高,同一地域不同地点的遗传分化要小,同一地点采集的样本无遗传变异。本文的研究也表明四川理塘、甘肃甘南、尼泊尔与青海玉树、西藏那曲、西藏林芝等不同省的地理区域之间冬虫夏草菌的基因序列有着明显的遗传分化和变异,但研究还发现位于同一省内而不同市区的西藏那曲与西藏林芝,因其海拔高度和纬度不相同,以至遗传分化明显较高,青海玉树与西藏那曲位于不同一省的地理区域,四川理塘、甘肃甘南、尼泊尔也位于不同一省的地理区域,因其海拔高度和纬度相近似,以至冬虫夏草的基因序列的遗传分化较低。究这种现象,根据 ITS 序列建立的系统发育树,在同一地域生长的冬虫夏草菌并不一定包含在同一个分支内,不同地域生长的冬虫夏草菌可能包含在同一个分支中。

参考文献

- Pandey A, Mohanty PS, Arya P, *et al.* Genetic diversity among the isolates of *Cordyceps sinensis* of higher himalayan meadows of India[J]. *Int J Sci Nat*, 2010, 1:242-245.
- Qian M(钱敏), Zeng W(曾纬), Zhang DL(张德利). Analysis of polymorphism in *Cordyceps sinensis* based on RAPD[J]. *Shizhen J Tradit Chin Med Res*(时珍国医国药), 2011, 22:1738-1739.
- Xie F(谢放), Zhu ZX(朱子雄), Chen JJ(陈京津). RAPD and analysis of ITS sequences of *Ophiocordyceps sinensis* in Gansu[J]. *Chin J Microecol*, 2011, 23:219-222.
- Wang W(王伟). In some areas of Qinghai *Cordyceps sinensis* RAPD analysis of genetic diversity[D]. Xining: Qinghai Normal University(青海师范大学), 2010.
- Zhu ZX(朱子雄), Xie F(谢放), Zhang N(张楠). Genetic diversity of *Ophiocordyceps sinensis* in Gansu province based

- on inter-simple sequence repeat (ISSR) analyses [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2011, 30: 501-507.
- 6 Wang XL, Yang RH, Yao YJ. Development of microsatellite markers for *Ophiocordyceps sinensis* (*Ophiocordycipitaceae*) using an ISSR-TAIL-PCR method [J]. *Am J Bot*, 2011, 98: 391-394.
 - 7 Wang W (王薇), Wang LL (王利丽), Xiong LL (熊莉丽), et al. ITS sequences as a DNA barcode in the identification and phylogenetics of *Cordyceps* [J]. *J Jiangsu Agric Sci* (江苏农业学报), 2012, 28: 680-682.
 - 8 Zuo DP (左登平), Li CR (李春如), Huang B (黄勃), et al. Molecular identification for connection of *Cordyceps formosana* and its *Hirsutella anamorph* [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2008, 27: 224-229.
 - 9 Seifert KA. Progress towards DNA barcoding of fungi [J]. *Mol Ecol Resour*, 2009, 9(S1): 83-89.
 - 10 Zhang YJ (张永杰), Sun BD (孙炳达), Zhang S (张姝), et al. Mycobiotic investigation of natural *Ophiocordyceps sinensis* based on culture-dependent investigation [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2010, 29: 518-527.
 - 11 Zhang WJ (张文娟), Wei F (魏锋), Ma SC (马双成). Application of ITS1 barcode sequence for the identification of *Cordyceps sinensis* from its counterfeit species [J]. *Chin J of Pharm Anal* (药物分析杂志), 2015, 35: 1716-1720.
 - 12 Zhang YJ, Xu LL, Zhang S, et al. Genetic diversity of *Ophiocordyceps sinensis*, a medicinal fungus endemic to the Tibetan plateau: implications for its evolution and conservation [J]. *BMC Evol Biol*, 2009, 9(1): 1-12.
 - 13 Cao L, Liu ZQ, Hao MG, et al. The methods for DNA extraction from various kinds of Chinese traditional medicines [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2004, 21: 465-468.
 - 14 Zhang YJ, Zhang S, Liu XZ, et al. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 51: 114-118.
 - 15 Lee SB, Taylor JW. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In PCR protocols: a guide to methods and applications, ed MA Innis, DH Gelfand, JS Sninsky, TJ White [M]. New York: Academic Press, 1990: 1-282.
 - 16 Rader V, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1985, 1(1): 17-20.
 - 17 Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence [J]. *J Mol Evol*, 1980, 16: 111-120.
 - 18 Chen YQ, Hu B, Xu F, 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.
 - 19 Hao JJ (郝剑瑾), Cheng Z (程舟), Liang HH (梁洪卉), et al. Genetic differentiation and distributing pattern of *Cordyceps sinensis* in China revealed by rDNA ITS sequences [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40: 112-116.
 - 20 Li Y (李渊). Epitypification, Taxonomy and genetic diversity research on *Ophiocordyceps sinensis* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2013.
-
- (上接第 1962 页)
- 15 Shen P (沈萍), Chen XD (陈向东). Experiment of microbiology (微生物学实验) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007: 28-34.
 - 16 Zhang DM (张大明). Studies on the inhibition effects of gross extracts of *Dioscorea zingiberensis* Wright CH. on main crop fungus and bacteris [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University (华中农业大学), 2005.
 - 17 Xi LS (席利莎), Sun HN (孙红男), Mu TH (木泰华), et al. The antioxidant activity *in vitro* and processing stability of sweet potato leaf polyphenols [J]. *J Chin Instit Food Sci Technol* (中国食品学报), 2015, 15: 147-156.
 - 18 Huang JL, Wei CY, Li QH. Study on the content of forsythin, total flavonoids of *Forsythia suspensa* and their antioxidant activity [J]. *Med Plant*, 2012, 6: 28-30.
 - 19 Yue XJ (岳秀洁), Li C (李超), Fu X (扶雄), et al. Optimization of ultrasonic extraction of flavonoids from *Moringa stenopetala* leaves and their antioxidant activities [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2016, 37: 226-231.
 - 20 Weng YT (瓮岳太), Xue Y (薛煜), Xu S (徐硕), et al. Extraction of total flavonoids from *Cronartium orientale* aeciospores by response surface methodology and its antioxidant activity *in vitro* [J]. *J Beijing Forestry Univ* (北京林业大学学报), 2017, 39: 38-47.
 - 21 Ma SQ (马士巧), Ma HL (马海乐), Pan ZL (潘忠礼), et al. Ultrasound-assisted extraction of propolis' flavonoids from the northeast China and its antibacterial activity [J]. *Food Ind* (食品工业), 2015, 12: 159-163.