

不同分离方法获得的冬虫夏草无性型菌株的交配型 基因 MAT1-2-1 的初步分析

张磊, 肖岩岩, 陈超, 李春如*

(安徽农业大学微生物防治省重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 对采用不同分离方法获得的 40 个冬虫夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*) 无性型菌株进行交配型基因 MAT1-2-1 的 PCR 特异扩增, 并随机取其中 7 个拼接好的 MAT1-2-1 的碱基序列, 与 4 个来自 GenBank 数据在内的共 11 个样品构建了系统发育树。结果表明, 采自青海的 7 个供试菌株, 连同 GenBank 中来自青海的菌株 (FJ654176) 共同组成了一大族群, 而 GenBank 中其他地区的菌株则聚成另外的类群; 随机分离得到的 10 个单子囊孢子菌株全部含有 MAT1-2-1 基因, MAT1-1: MAT1-2 未见按 4:4 进行分离, 提示冬虫夏草极有可能是同宗配型。

关键词: 冬虫夏草; 无性型菌株; MAT1-2-1 基因; 单子囊孢子; 同宗配型

中图分类号: Q949.32

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)05-0819-04

Preliminary analysis of MAT1-2-1 mating type genes of anamorphic isolates from different sources of *Ophiocordyceps sinensis*

ZHANG Lei, XIAO Yan-yan, CHEN Chao, LI Chun-ru

(Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: There is close relationship between the mating type gene of *Ophiocordyceps sinensis* and the artificial introduction of fruiting body. Many scholars focus on the mating type of *O. sinensis*, and MAT1-2-1 sequences of 40 isolates of *O. sinensis* by different methods were amplified with the primers MAT1-2-1 and evolutionary phylogenetic analyses were performed with sequences of the MAT1-2-1 gene, of which 7 sequences of MAT1-2-1 came from this experiment randomly and 4 sequences of MAT1-2-1 cited from the GenBank data. The result showed that 7 isolates collected from Qinghai, together with the isolates from Qinghai in GenBank make up a large group with the 96% bootstrap value and the isolates from the other area clustered into the other part. Meanwhile, all of single ascospore isolates of *O. sinensis* contain the MAT1-2-1 gene and the ratio of MAT1-1: MAT1-2 has not been found by 4:4. So *O. sinensis* might not be heterothallism, to a large extent, it is homothallic.

Key words: *Ophiocordyceps sinensis*; anamorph; MAT1-2-1 gene; single ascospore; homothallic

冬虫夏草 (*Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) Sung) 别名虫草、冬虫草、夏草冬虫。根据 Sung 等人的最新的分类系统, 冬虫夏草隶属于真菌界 (*Fungi*)、子囊菌门 (*Ascomycota*)、盘菌亚门 (*Pezizomycotina*)、粪壳菌纲 (*Sordariomycetes*)、肉座菌亚纲 (*Hypocreomycetidae*)、肉座菌目 (*Hypocreales*)、线虫草科 (*Ophiocordycipitaceae*)、线虫草属 (*Ophiocordyceps*)^[1], 目前已确定其无性

型是中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu & Zeng)。由于其具有重要的医疗保健作用和相当大的经济价值, 因此近几年来受到了学者们的广泛关注^[2-3]。近年来, 随着人们研究的深入, 对冬虫夏草的研究扩展到多个领域, 主要涉及到以下内容: 冬虫夏草的有效成分^[4]、体细胞融合杂交育种^[5]、交配型基因的研究及发酵条件的研究^[6]。这为活性物的高产菌株的获得, 子实体的人工培育, 以及虫草

收稿日期: 2013-03-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2007AA021506) 和教育部留学回国人员科研启动基金 (2009 年) 共同资助。

作者简介: 张磊, 男, 硕士研究生。

* 通信作者: 李春如, 男, 博士, 教授。E-mail: chunruli@hotmail.com

资源的保护等提供研究基础。

在子囊菌中, 交配型基因 (MAT) 在很大程度上决定子囊菌的有性交配模式是异宗配合还是同宗配合。异宗配合的子囊菌, 存在 MAT1 和 MAT2 两种交配型, 但每一个菌株只能拥有一个等位基因 (MAT1-1 或 MAT1-2); 而同宗配合的子囊菌, 只有一种交配型, 每个菌株同时拥有两个等位基因 (MAT1-1 和 MAT1-2)。因此, 只有了解了子囊菌交配型类型, 才能准确地判定该子囊菌的交配模式。近些年来, 国内外对子囊菌的交配型基因的研究成果取得一些进展。最近, Zhang 等人研究发现冬虫夏草的 MAT1-2-1 基因包含 895 个碱基对, 编码 249 个氨基酸。MAT1-2-1 基因与编码 DNA 裂解酶基因之间的距离明显大于蛹虫草和高雄山虫草^[7]。Sung 等人的研究结果显示鲜红虫草 (*Cordyceps cardinalis*) 需要两种不同的交配型单孢子分离株才能形成子实体, 是典型的异宗配合^[8]。贵州大学学者发现所有不产子实体的蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 单孢子分离株具备的是单一配型, 不是 MAT1-1 型就是 MAT1-2 型, 而所有能产子实体的菌株都具备 MAT1-1 和 MAT1-2 两个配型, 该结果说明蛹虫草是异宗配合真菌^[9]。这与 Shrestha 等人的研究结论是一致的^[10]。2003 年, Yokayama 等人首次报道了高雄山虫草 (*Cordyceps takaomontana*) 两种交配型基因的核苷酸序列^[11]。他们还根据 MAT1-1-1 基因和 MAT1-2-1 基因编码蛋白中称为 α 框和 HMG 框的保守区域设计了两对简并引物, 来分析麦角菌类真菌的交配型基因, 并最终验证了高雄山虫草为异宗配合真菌^[12]。2006 年, Yokayama 等又通过扩增 18S rRNA 基因和交配型基因对麦角菌科真菌进行系统发育和结构分析, 认为基于交配型基因的系统发育分析分辨率要好于 18S rRNA 基因。这也为交配型基因在系统发育分析中应用提供了理论依据^[13-14]。Zhang 等用 nrDNA ITS 和 MAT1-2-1 两个基因序列, 评估了来自青藏高原不同地域的 11 个种群的 56 个冬虫夏草标本及其分离体后则认为, 冬虫夏草存在着明显的遗传分化^[15]。这表明交配型基因也可用来确定菌株间的遗传分化程度。

作者在本实验室研究的基础上用 MAT1-2-1 基因序列对 7 个同一地区分离得到的中国被毛孢菌株和 4 个从 GenBank 下载的中国被毛孢 MAT1-2-1 序列构建系统发育进化树, 以此来确定不同分离方法及来源的菌株间的遗传分化程度和种群多样性。

冬虫夏草交配型基因与其有性生殖有紧密联系, 确定冬虫夏草的交配型模式对研究有性生殖的研究

具有重要意义。而由于虫草属的子囊孢子和次生子囊孢子均为单倍体^[16-17], 因此如果能够分析出冬虫夏草的单子囊孢子菌株中 MAT1-1 和 MAT1-2 基因的比例, 就能推测出冬虫夏草菌株的交配模式。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及其来源

供试的 40 个菌株, 于 2009 年 5 月采自青海省青沙山, 其中有 10 株为子囊单孢子分离法获得的单子囊孢子菌株^[18], 22 株系组织分离 (13 株分离自冬虫夏草子座, 9 株分离自冬虫夏草菌核) 所得, 7 株系子囊孢子弹射后分离所得, 1 号菌株来自上海。以上分离所得菌株经纯化、鉴定后, 保存于安徽农业大学微生物防治省重点实验室。

1.2 主要培养基

1.2.1 水琼脂分离培养基配方 琼脂粉 15 g, 最后加蒸馏水定容为 1 000 mL。灭菌冷却至 40~50℃ 加入 0.04% 的青霉素和 0.1% 的盐酸链霉素。

1.2.2 PDA 分离培养基配方 去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加水煮沸 20 min, 两层纱布过滤, 另加葡萄糖 20 g, 琼脂粉 15 g, 最后加蒸馏水定容为 1 000 mL。灭菌后加入 0.04% 的青霉素和 0.1% 的盐酸链霉素。

1.2.3 液体培养基 去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加水煮沸 20 min, 两层纱布过滤, 另加葡萄糖 10 g, 麦芽糖 40 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸出粉 10 g, KH₂PO₄ 3 g, MgSO₄ 1.5 g, 柠檬酸三胺 0.4 g, 复合维生素 B 片 4 片, 最后加蒸馏水定容为 1 000 mL。

1.2.4 固体培养基 其它成分同液体培养基, 另外加琼脂粉 15 g, 最后加蒸馏水定容为 1 000 mL。

1.3 MAT1-2-1 基因的扩增与分析

1.3.1 MAT1-2-1 基因扩增引物 参照 Zhang 等^[15] 的 MAT1-2-1 基因特异性扩增引物: MAT1-2F₁ (5'-CCACCGATCCAAGTCTCCT-3'); MAT1-2R₂ (5'-CAGTTTCAGTCGCTGTCGTG-3')。对交配型基因 MAT1-2-1 区域进行扩增。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.3.2 交配型基因 MAT1-2-1 的扩增反应体系与程序 反应体系 (25 μ L): 10 \times PCR Buffer 5 μ L, 2.5 mmol·L⁻¹ 的 dNTPs 5 μ L, 10 μ mol·L⁻¹ MAT1-2F₁ 和 MAT1-2R₂ 各 2 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 最后用去离子水将反应体系补足为 50 μ L。

PCR 循环程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 70 s, 共 35 个循环; 最后于 72℃ 补平 10 min。

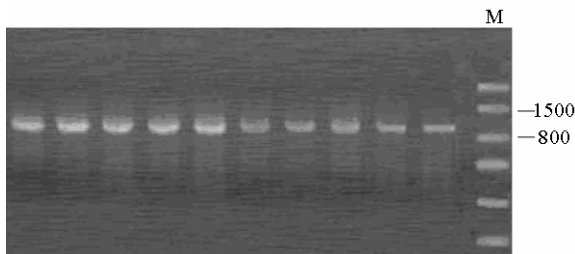
扩增结束后取 7 μL 的 PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖 (含 EB 的终浓度为 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 中电泳, 电压为 3 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$, 电泳缓冲液高于胶面 3~5 mm。最后用 Tanon GIS-2008 凝胶成像系统检测拍照。

1.3.3 测序与序列分析 扩增产物的纯化与测序均由 Invitrogen 公司 (上海英骏生物技术有限公司) 完成, 在 DNA 自动测序仪上进行测序。测序结果用 DNAMAN 软件将供试菌株的 MAT1-2-1 序列与 GenBank 中的相关序列进行比对及同源性分析。

2 结果与分析

2.1 MAT1-2-1 基因的 PCR 扩增产物的电泳检测

对本实验分离获得的 40 个菌株进行 PCR 特异扩增, 扩增产物经琼脂糖电泳检测, 得到如下结果: 35 个菌株得到一条明亮清晰的 DNA 条带, 其中包含了全部的 10 个单子囊孢子菌株。而剩余 5 个菌株 (1、12、15、16、29) 无条带出现, 未得到 PCR 扩增产物。可以得出, 35 个中国被毛孢菌株含有 MAT1-2-1 基因, 仅子座分离得到的 4 个菌株和购于上海的 1 号菌株未得到 MAT1-2-1 基因的 PCR 扩增产物。



M: DNA 标准分子量 M: DNA marker

图 1 部分菌株的 MAT1-2-1 基因 PCR 检测结果

Figure 1 MAT1-2-1 gene amplification products of some isolates used in this study

2.2 MAT1-2-1 基因序列分析

选取不同分离方法获得的部分菌株进行测序, 取其中 7 个拼接好的序列, 与 4 个来自 GenBank 数据在内的 11 个样品的 MAT1-2-1 基因碱基序列进行比对, 发现菌株的碱基序列基本一致。以上述序列数据为基础而形成的树型图 (图 2) 表明, 本实验采自青海的 7 个供试菌株, 连同 GenBank 中来自青海的菌株 (FJ654176) 共同组成了一大类群, 其 bootstrap 值为 96%, 而其他地区的菌株聚成另外的类群。由此可知, MAT1-2-1 基因序列对于不同地区的菌株遗传多样性有一定的区分度, 但不能很好的揭示同一地区的菌株的遗传变异性。

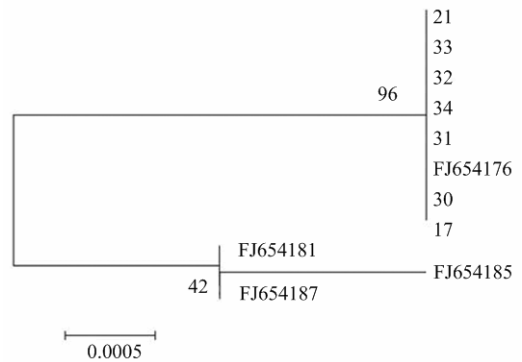


图 2 基于 MAT1-2-1 序列的部分中国被毛孢菌株的系统发育分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of some *Hirsutella sinensis* isolates based on the data of MAT1-2-1

2.3 交配型基因分析

从单子囊孢子方面进行分析, 8-子囊孢子四分子分析证实, 在大多数异宗配合的子囊菌的子囊中, 子囊孢子的 MAT1-1:MAT1-2 是按 4:4 进行分离的。本实验随机分离得到的 10 个单子囊孢子菌株全部含有 MAT1-2-1 基因, 可以看出冬虫夏草的 MAT1-1:MAT1-2 不是按 4:4 进行分离, 因此中国被毛孢可能不是异宗配合菌, 极可能是同宗配型。

3 讨论

生物学中对遗传多样性的研究具有重要的理论和实际意义。首先, 物种或种群的遗传多样性大小是长期进化的产物, 是其生存适应和发展进化的前提^[19]。其次, 对遗传多样性的认识是生物各分支学科重要的背景资料^[20]。再者, 遗传多样性是保护生物学研究的核心之一, 不了解种内遗传变异的大小、时空分布及其与环境条件的关系, 我们就难以采取科学有效的措施来保护人类赖以生存的遗传资源基因, 保护受到威胁的物种^[21]。

本实验发现中国被毛孢菌株的 MAT1-2-1 基因序列对于不同地区的菌株遗传多样性有一定的区分度, 但对于来自同一地区的菌株的遗传差异未能有效的检测出。这可能是由于本实验只是分析了 MAT1-2-1 基因的部分序列, 因此所包含的信息量不够。所以如果要检测出同一地区中国被毛孢的遗传差异, 使用 ISSR 可能会更加合适。

8-子囊孢子四分子分析证实, 在大多数异宗配合的子囊菌的子囊中, 子囊孢子的 MAT1-1:MAT1-2 是按 4:4 进行分离的。所以本实验随机分离获得 10 个单子囊孢子菌株, 以期获得子囊孢子的 MAT1-1 与 MAT1-2 的比例。Zhang Y J 等发现其实验所研究

的56个菌株全都含有MAT1-2-1基因,进而推测冬虫夏草的交配型可能为同宗配型^[15]。而本实验得出10个单子囊孢子菌株全部含有MAT1-2-1基因,即冬虫夏草子囊孢子的MAT1-1:MAT1-2不是按4:4进行分离,因此本实验进一步说明了冬虫夏草可能为同宗配型。

本实验之所以使用冬虫夏草的单子囊孢子菌株作为出发株来研究其交配型模式,是因为冬虫夏草的每一个子囊孢子及其隔细胞均由子囊中相应的未成熟子囊孢子发育而来,而未成熟子囊孢子是经子囊细胞减数分裂而来,因此是单倍体,所以每个子囊孢子及其隔细胞也均为单倍体且基因相同^[16]。由此可以推断,若一个子囊孢子中只含有一种交配型基因,那么由其萌发而来的菌株一定只含有相同的交配型基因;反之,若一个子囊孢子中含有两种交配型基因,那么相应的菌株也定含有两种交配型基因。所以使用单子囊孢子菌株作为出发株研究冬虫夏草的交配型模式,可以排除干扰,使结果更具有说服力。

参考文献:

- [1] Sung G H, Hywel-Jones N L, Sung J M, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi[J]. *Studies in Mycology*, 2007, 57(1): 5-59.
- [2] 王战建, 王书畅. 冬虫夏草治疗糖尿病肾病的作用机制研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2008, 9(1): 88-89.
- [3] Nakamura K, Konobak K, Yamaguchi Y, et al. Combined effects of *Cordyceps sinensis* and methotrexate on hematogenic lung metastasis in mice[J]. *Receptors and Channels*, 2003, 9(5): 329-334.
- [4] 刘彦威, 刘娜, 刘利强. 冬虫夏草有效成分的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2004, 25(3): 51-53.
- [5] Holliday J C, Cleaver P, Loomis-Powers M, et al. Analysis of quality and techniques for hybridization of medicinal fungus *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (Ascomycetes)[J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2004, 6: 151-164.
- [6] 葛飞, 桂琳, 李春如, 等. 冬虫夏草无性型—中国被毛孢固态发酵条件的初步探究[J]. *生物学杂志*, 2009, 26(3): 23-25.
- [7] Zhang S, Zhang Y J, Liu X Z, et al. Cloning and analysis of the MAT1-2-1 gene from the traditional Chinese medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis*[J]. *Fungal Biology*, 2011, 115 (8): 708-714.
- [8] Sung G H, Shrestha B, Han S K, et al. Heterothallic type of mating system for *Cordyceps cardinalis*[J]. *Mycobiology*, 2010, 38(4): 282-285.
- [9] 李闯锋. 蛹虫草形成子实体表型差异的分子生物学研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2007.
- [10] Shrestha B, Kim H K, Sung G H, et al. Bipolar heterothallicism, a principal mating system of *Cordyceps militaris* in vitro[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2004, 9(6): 440-446.
- [11] Yokayama E, Yamagishi K, Hara A. Structures of the mating-type loci of *Cordyceps takaomontana*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 5019-5022.
- [12] Yokayama E, Yamagishi K, Hara A. Heterothallicism in *Cordyceps takaomontana*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 250(1): 145-150.
- [13] Yokayama E, Yamagishi K, Hara A. Development of a PCR-based mating-type assay for *Clavicipitaceae*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 237 (2): 205-212.
- [14] Yokayama E, Arakawa M, Yamagishi K, et al. Phylogenetic and structural analyses of the mating-type loci in *Clavicipitaceae*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 264 (2): 182-191.
- [15] Zhang Y J, Xu L L, 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 Evolutionary Biology*, 2009, 9: 290.
- [16] 刘作易, 梁宗琦, 辛智海. 冬虫夏草显微结构再观察和子囊孢子发育研究[J]. *贵州科学*, 2003, 21(1/2): 51-57.
- [17] Shrestha B, Han S K, Yoon K S, et al. Morphological characteristics of conidiogenesis in *Cordyceps militaris*[J]. *Mycobiology*, 2005, 33(2): 69-76.
- [18] 肖岩岩, 陈超, 董建飞, 等. 冬虫夏草子囊孢子及其无性型在培养过程中的形态学观察[J]. *安徽农业大学学报*, 2011, 38(4): 587-591.
- [19] Soltis P S, Soltis D E. Genetic variation in endemic and widespread plant species: examples from *Saxifragaceae* and *Polystichum* (Dryopteridaceae)[J]. *Aliso*, 1991, 13(1): 215-223.
- [20] Moritz C, Hillis D M. Molecular systematics context and controversies[M]// Hillis D M, Moritz C. *Molecular systematics*. Sunderland: Sinauer Associate Inc, 1990: 1-11.
- [21] Karron J D. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species [M]// Falk D A, Holsinger K E. *Genetics and conservation of rare plants*. New York: Oxford University Press, 1991: 87-98.