

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2024.04.001

中国主产区冬虫夏草菌 ITS 基因及其寄主蝙蝠蛾 COI 基因的系统发育学分析

杜玉杰¹, 李劲涛², 陈玉龙³

(1. 湛江幼儿师范专科学校(岭南师范学院基础教育学院), 广东 湛江 524037; 2. 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124; 3. 四川省林科院资源生态与环境研究所, 四川 成都 610081)

摘要: [目的] 对冬虫夏草菌 ITS 基因序列及其寄主蝙蝠蛾 COI 基因序列进行系统发育学分析, 研究其遗传分化和变异程度。[方法] 采用系统发育分析法, 分析 ITS 基因、COI 基因序列并构建系统发育树, 计算序列单倍型多样性 (H_d)、核苷酸多态性 (P_i)。[结果] 冬虫夏草菌 ITS 基因序列可分为 17 个单倍型, $H_d=0.875$, $P_i=0.00119$; 寄主蝙蝠蛾 COI 基因序列可分为 18 个单倍型, $H_d=1.000$, $P_i=0.00034$ 。利用基因替代速率推测冬虫夏草菌至少起源于 58.3 百万年前, 寄主蝙蝠蛾约起源于 17.5 百万年前。[结论] 冬虫夏草菌及其寄主蝙蝠蛾的遗传差异均与所处纬度无关, 且遗传距离与地理距离无相关性; 中国主产区冬虫夏草菌及其寄主蝙蝠蛾群体具有丰富的遗传和分化多样性, 可能是冬虫夏草菌及其寄主蝙蝠蛾的起源之一; 冬虫夏草菌的分化时间明显早于寄主蝙蝠蛾, 推测冬虫夏草菌在寄生蝙蝠蛾之前可能以土生方式存在或者有另外的寄主, 在寄生蝙蝠蛾后二者产生了协同进化关系, 并促使寄主蝙蝠蛾的多样性分化。

关键词: 冬虫夏草菌; 蝙蝠蛾; ITS 基因; COI 基因; 系统发育; 遗传差异

中图分类号: S567.35 文献标志码: A 文章编号: 1673-1891(2024)04-0001-11

Phylogenetic Analysis of the ITS Gene of *Cordyceps sinensis* and the COI Gene of Its Host *Hepiaua larva* in the Main Production Areas of China

DU Yujie¹, LI Jintao², CHEN Yulong³

(1. Zhanjiang Preschool Education College (College of Basic Education, Lingnan Normal University), Zhanjiang 524037, Guangdong, China; 2. School of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; 3. Institute of Resources, Ecology and Environment, Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, Sichuan, China)

Abstract: [Objective] To analyse the ITS gene sequence of *Cordyceps sinensis* and the COI gene sequence of its host *Hepiaua larva* so as to study their genetic differentiation and variation degree. [Method] Using phylogenetic analysis, the phylogeny trees were constructed based on the analyses of ITS gene and COI gene, and haplotype diversity (H_d) and nucleotide diversity (P_i) of the sequences were calculated. [Result] The ITS gene sequences of *Cordyceps sinensis* could be di-

收稿日期: 2024-09-01

基金项目: 广东省普通高校特色创新类项目(2022KTSCX350); 北京市教委科技计划一般项目(KM201910005004); 四川省财政专项(ZL2017-06); 湛江市工程技术研究中心项目(2022A115)。

作者简介: 杜玉杰(1982—), 女, 河南周口人, 副教授, 硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学、食品科学, e-mail: xiaoshuidi156@126.com。

vided into 17 haplotypes, with $H_d=0.875$ and $P_i=0.001\ 19$. The *COI* gene sequences of *Hepiaua larva* could be divided into 18 haplotypes, with $H_d=1.000$ and $P_i=0.000\ 34$. Using the gene replacement rate, it was estimated that *Cordyceps sinensis* dated back to at least 58.3 million years ago while the *Hepiaua larva* originated from about 17.5 million years ago. [Conclusion] The genetic differences between *Cordyceps sinensis* and its host *Hepiaua larva* are both unrelated to the latitude where they are located and their genetic distances show no correlation with their geographical distances. The *Cordyceps sinensis* and its host *Hepiaua larva* possess rich genetic and differentiation diversities in the main production areas of China, which may be one of the origins of them. The differentiation time of *Cordyceps sinensis* was significantly earlier than that of *Hepiaua larva*, and it was speculated that *Cordyceps sinensis* might have existed in an indigenous way or had other hosts before parasitizing *Hepiaua larva*. After parasitizing *Hepiaua larva*, a co-evolutionary relationship was formed between them, which promoted the diversity and differentiation of the *Hepiaua larva*.

Keywords: *Cordyceps sinensis*; *Hepiaua larva*; *ITS* gene; *COI* gene; phylogeny; genetic difference

0 引言

内部转录间隔区(internal transcribed spacer, *ITS*)基因序列由于不加入成熟的核糖体,受到的选择压力较小,进化速率更快,且 *ITS* 基因片段(500~700 bp)长短适中,中度保守,可以提供较丰富的信息位点和变异位点。因此, *ITS* 基因在种间差异比较明显,常用作种间和种内的系统分类鉴定和亚种、变种的分类及菌株的分类鉴定,是高等真菌属内种间及种群系统学研究的基因标记,被国内外专家认为是作为菌物界 DNA 条形码的一个标记分子^[1]。细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome C oxidase I, *COI*) 基因,为线粒体基因,是母系遗传,突变速率比较快,所以经常用来作分类、鉴定和进化的研究^[2]。

冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*)是我国传统的珍稀药用真菌,属真菌界(Fungi)真菌门(Eumycophyta)子囊菌亚门(Ascomycotina)核菌纲(Pyrenomycetes)麦角菌目(Clavicipitales)麦菌科(Chavicipitaceae)虫草属(*Cordyceps*)^[3],是冬虫夏草菌孢子侵染鳞翅目蝙蝠蛾幼虫后,吸收其营养发育而成的、由子座和菌核构成的菌体。冬虫夏草主要生长在海拔 3 500~5 000 m 的高山灌丛和草甸中,尤其常见于积雪、排水良好的高寒草甸^[4],在我国主产于四川、西藏、青海、云南等省(自治区)。

我国传统医学认为冬虫夏草具有补肾益肺,止

血化痰功效^[5-6],现代医学研究认为其所含的虫草多糖是很好的免疫促进剂,具有提高免疫能力、抗疲劳作用^[7]。因此冬虫夏草的药用价值^[8-13]、分子系统发育^[14-20]、重金属含量等^[21-26]一直是科研人员关注的热点。关于分子系统发育方面研究所采集的标本多限于云南、青海、西藏产区,而被《本草从新》认定品质最佳的四川产区的冬虫夏草鲜见作为研究样品。

本研究以四川产区作为主要采集区,同时兼顾青海、甘肃、西藏 3 个省(自治区)部分产区,共计采集 40 个产区的样本作为研究对象,对冬虫夏草菌 *ITS* 基因及其寄主蝙蝠蛾 *COI* 基因进行扩增、测序,并进行分子系统发育分析,探讨冬虫夏草遗传分化和变异情况,以期对冬虫夏草野生资源的合理利用和保护、冬虫夏草菌与寄主蝙蝠蛾协同进化、冬虫夏草产地鉴定和溯源等方面研究提供数据支撑和理论依据。

1 材料与方法

1.1 冬虫夏草材料信息

本研究的冬虫夏草材料于 2017 年 4—6 月采集,来源于四川、西藏、青海和甘肃共计 40 个产区的样本,其中用于 *ITS* 基因序列研究的样本 38 个(编号 1~38),用于 *COI* 基因序列研究的样本 14 个(编号 27~40),详细信息如表 1 所示。材料去除泥土并清洗,然后采用防腐液体浸泡制作标本, -80 °C 保存。

表1 冬虫夏草样本信息

编号	样本名称	地理来源	纬度
1	BT	四川省甘孜藏族自治州巴塘县	北纬28°46'~30°38'
2	BY	四川省甘孜藏族自治州白玉县	北纬30°22'~31°40'
3	DFA	四川省甘孜藏族自治州道孚县A	北纬32°21'~30°32'
4	DFB	四川省甘孜藏族自治州道孚县B	北纬32°21'~30°32'
5	DR	青海省果洛藏族自治州达日县	北纬31°24'~32°54'
6	DRB	四川省甘孜藏族自治州得荣县	北纬28°09'~29°10'
7	GBJD	西藏自治区林芝市工布江达县	北纬29°89'
8	HS	四川省阿坝藏族羌族自治州黑水县	北纬31°35'~32°38'
9	JC	四川省阿坝藏族羌族自治州金川县	北纬31°0'~31°58'
10	JZG	四川省阿坝藏族羌族自治州九寨沟县B	北纬32°53'~33°43'
11	LTRJG	四川省甘孜藏族自治州理塘县GJG	北纬28°57'~30°43'
12	LX	四川省阿坝藏族羌族自治州理县	北纬30°54'~31°12'
13	LZ	西藏自治区林芝市	北纬29°59'
14	MRK	四川省阿坝藏族羌族自治州马尔康市	北纬30°35'~32°24'
15	MX	四川省阿坝藏族羌族自治州茂县	北纬31°24'~32°17'
16	RT	四川省阿坝藏族羌族自治州壤塘县	北纬31°29'~32°41'
17	SP	四川省阿坝藏族羌族自治州松潘县	北纬32°06'~33°09'
18	SQ	四川省甘孜藏族自治州石渠县	北纬32°98'
19	XC	四川省甘孜藏族自治州乡城县	北纬28°34'~29°39'
20	XH	甘肃省甘南藏族自治州夏河县	北纬34°32'~35°34'
21	XJA	四川省阿坝藏族羌族自治州小金县A	北纬30°35'~31°43'
22	XJB	四川省阿坝藏族羌族自治州小金县B	北纬30°35'~31°43'
23	XL	四川省甘孜藏族自治州新龙县	北纬30°23'~31°32'
24	YJ	四川省甘孜藏族自治州雅江	北纬29°03'~30°30'
25	YJG	四川省甘孜藏族自治州雅江县	北纬29°03'~30°30'
26	LKY	四川省林科院	北纬30°67'
27	GL	青海果洛藏族自治州	北纬32°31'~35°40'
28	GZ	四川省甘孜藏族自治州甘孜县	北纬31°24'~32°54'
29	HSB	四川省阿坝藏族羌族自治州黑水县B	北纬31°35'~32°38'
30	HY	四川省阿坝藏族羌族自治州红原县	北纬31°51'~33°33'
31	JZ	四川省阿坝藏族羌族自治州九寨沟县	北纬32°53'~33°43'
32	KD	四川省甘孜藏族自治州康定市	北纬29°08'~30°46'
33	LTMB	四川省甘孜藏族自治州理塘县MB	北纬28°57'~30°43'
34	MQ	甘肃省甘南藏族自治州玛曲县	北纬33°06'~34°30'
35	RRG	四川省阿坝藏族羌族自治州若尔盖县	北纬32°56'~34°19'
36	SD	四川省甘孜藏族自治州康定市沙德	北纬29°08'~30°46'
37	SDX	四川省甘孜藏族自治州康定市沙德镇	北纬29°08'~30°46'
38	TJ	四川省巴中市通江县	北纬31°39'~32°33'
39	DC	四川省甘孜藏族自治州稻城县	北纬27°58'~29°30'
40	DYGB	四川省甘孜藏族自治州得荣县B	北纬28°09'~29°10'

1.2 方法

1.2.1 冬虫夏草菌菌丝及其寄主蝙蝠蛾 DNA 提取

冬虫夏草的昆虫部分被真菌感染后大部分组织已经被菌丝消耗分解,仅存在少量未分解的昆虫组织,故本试验提取整个冬虫夏草全基因组 DNA,且尽量选取残留较多虫头部、腹足等部位的冬虫夏草材料。

用预冷无菌研钵以洁净液氮研磨成均匀粉末,

按照组织 DNA 提取试剂盒(100T,北京索莱宝生物科技有限公司)说明书操作,提取样本总 DNA。

1.2.2 目的基因 PCR 扩增

1) PCR 扩增反应引物。

对冬虫夏草菌部分核糖体内的 *ITS* 基因序列和冬虫夏草寄主部分线粒体上的 *COI* 基因部分片段进行 PCR 扩增分析,由四川省成都擎科梓熙生物技术有限公司进行引物合成,合成引物序列如表 2 所示。

表 2 冬虫夏草菌体的 PCR 扩增引物

基因	引物名称	引物序列 5'~3'	目的片段长度/bp	引物来源
<i>ITS</i>	<i>ITS</i> -正向引物	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	约 500	White 等(1990) ^[27]
	<i>ITS</i> -反向引物	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
<i>COI</i>	<i>COI</i> -正向引物	GCGAAAATGACTTTATTCTAC	约 1 500	Simon 等(1994) ^[28] , Simon 等 2006) ^[29]
	<i>COI</i> -反向引物	TATATGAATGTTCTGCTGGTGG		

2) PCR 扩增反应条件及体系。

ITS 基因扩增的反应体系(25 μL):灭菌去离子水 19.3 μL 、10 \times Buffer (含 2 mmol/L Mg^{2+}) 2.5 μL 、2.5 mmol/L dNTP 1 μL 、20 $\mu\text{mol/L}$ *ITS*-正向引物和 *ITS*-反向引物各 0.5 μL 、5 $\mu\text{mol/min}$ Taq 酶 0.2 μL 、模板 1 μL 。*ITS* 基因扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,循环 35 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

COI 基因扩增的反应体系(25 μL):灭菌去离子水 15.75 μL 、10 \times Buffer (含 2 mmol/L Mg^{2+}) 2.5 μL 、2.5 mmol/L dNTP 2.5 μL 、5 $\mu\text{mol/L}$ *COI*-正向引物、*COI*-反向引物各 1.0 μL 、5 $\mu\text{mol/min}$ Taq 酶 0.25 μL 、模板 2 μL 。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;45 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 75 s,循环 6 次;94 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,51 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 75 s,循环 36 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3) PCR 产物电泳检测及测序。

取 2 μL PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶(含 Gold-view TM DNA 染料)电泳检测,加 0.5 μL 6 \times 溴酚蓝缓冲液,混匀,混合液上样检测,电压 120 V,电泳 25 min,完成后于紫外凝胶成像系统中拍照检测。

PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.3 测序数据处理及分析

对所测原始序列的 *N* 值和计算机误读的少量碱基进行人工修正,并使用 MEGA 6.06 软件中的 Clustal X 功能进行多序列比对,切除测序起始部分质量不佳的片段,同时为使序列长度一致,需切除两端不整齐的冗余序列。获得整齐序列后,于 NCBI 中进行 BLAST 相似性检索,以确保所扩增出片段是所需的目标片段以及序列方向的一致。采用 MEGA 6.06 软件进行系统发育分析,并对序列展开分支分析和统计分析,计算基因序列间的一级结构,计算序列间 Kimura2 遗传距离,得到遗传距离矩阵并以此为基础采用最大释然法(ML)构建系统发育树,用自展法(bootstrap)检验系统树,自展数据集为 1 000 次,并基于系统发育树利用基因替代速率估算冬虫夏草菌及其寄主蝙蝠蛾的分化时间。利用 DnaSP v. 5.0 软件计算单倍型多样性(haplotype diversity,用 H_d 表示)和核苷酸多态性(nucleotide diversity,用 P_i 表示)这 2 项多样性指标,统计单倍型序列特征以及各个居群单倍型数量和种类。利用 Ge-

nAlEx 6.41 软件进行 Mantel test 统计学检验,分析序列地理距离与遗传距离间的相关性。

2 结果与分析

2.1 ITS 基因序列的系统发育学结果与分析

2.1.1 系统发育树

筛选 GenBank 中具有地理来源和注释较为可靠的 7 条 ITS 基因序列,序列信息如表 3 所示。将表 3 所标记的冬虫夏草产区进行区域划分,分为 4 个区域,西藏地区(LZ2、JIACHA),青海地区(YS、QH1、MY),云南地区(DQ)、甘肃地区(GS1)。结合本试验测得的冬虫夏草菌体 38 条 ITS 基因序列,共计 45 条用于数据分析,覆盖了冬虫夏草在四川分布区和其他部分省(自治区)的分布。

表 3 来源于 GenBank 的相关序列信息

样品名称	地理来源	ITS 登录号
LZ2	西藏自治区林芝市	EU570169.1
JIACHA	西藏自治区山南市加查县	EU570946.1
YS	青海省玉树藏族自治州	EU570954.1
QH1	青海	KM652173.1
MY	青海省海北藏族自治州门源回族自治县	EU570947.1
DQ	云南省迪庆藏族自治州德钦县	EU570927.1
GS1	甘肃	EU570951.1

对不同地理来源的冬虫夏草菌体 45 条 ITS 基因序列进行分析。冬虫夏草菌体 ITS 基因序列长度为 596 bp 左右,保守位点有 398 个,说明不同地理来源的冬虫夏草菌 ITS 基因序列具有较高的保守性,GC 质量分数 62%~64%,碱基组成具有明显的 GC 偏向性。利用 MEGA 6.06 软件对 45 条序列进行多重比对,计算序列之间的 Kimura2 遗传距离,得遗传距离矩阵并以此为基础采用最大释然法(ML)构建分子系统发育树,采用自展法(bootstrap)检验系统树,自展数据集为 1 000 次,构建系统发育树如图 1 所示。

ITS 基因系统发育树显示,45 条序列区分为 6 个不同的分支,如表 4 所示。各分支样品所在地的纬度差异不大且有交叠情况,表明冬虫夏草菌遗传差异与纬度无关。

2.1.2 遗传多样性

利用 DnaSP 5.0 软件对 45 条冬虫夏草菌 ITS 基因序列进行分析,结果显示,在物种水平上,所有冬虫夏草菌 ITS 基因序列有 17 个单倍型, $H_d=0.875$, $P_i=0.00119$ 。其中,单倍型多样性(H_d)是指从种群内任意选择 2 条序列,2 条序列属不同单倍型的概率,其数值区间为 0~1,数值越大,代表其遗传多样性高,遗传资源丰富;核苷酸多样性(P_i)是指从种群中随机选择 2 条序列,在 2 条序列上随机选一个位置相同点,在这个位点上 2 条序列碱基不相同的概

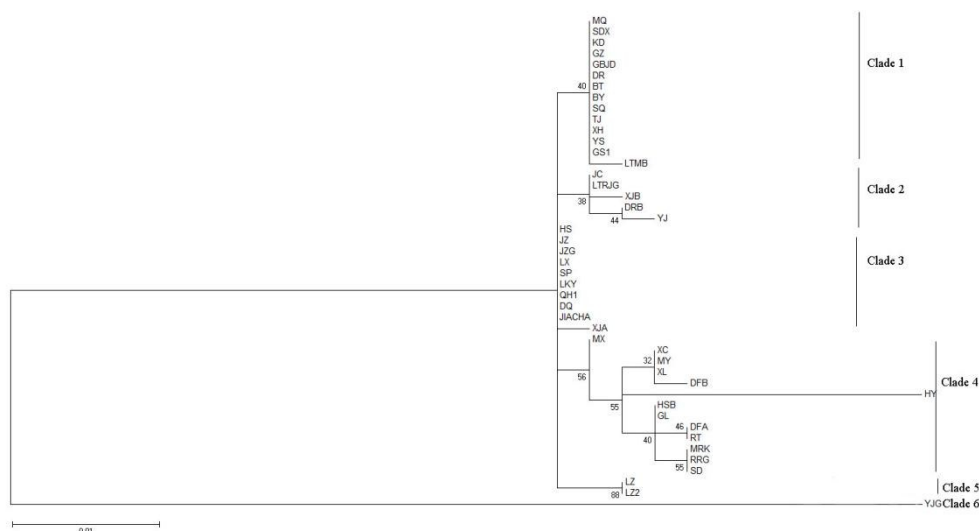


图 1 冬虫夏草菌 ITS 基因序列系统发育树

表 4 冬虫夏草菌 *ITS* 基因系统发育树分支及其样品所在地区

分支编号	分支包含样品所在地区	纬度跨度
Clade 1(分支 1)	1. 四川西部的巴塘、白玉、甘孜、康定、达日、通江、沙德镇、石渠 2. 甘肃地区的玛曲、夏河、甘肃 1 3. 青海地区的玉树 4. 西藏自治区林芝市工布江达县	北纬 28°46'~35°34'
Clade 2(分支 2)	四川南部的金川、理塘、小金 B、得荣县、雅江	北纬 28°09'~31°58'
Clade 3(分支 3)	1. 四川东部的黑水、九寨沟、九寨沟 B、松潘、理县、小金县 A 2. 青海地区的青海 1 3. 云南地区的德钦 4. 西藏地区的加查 5. 四川林科院	北纬 27°33'~33°43'
Clade 4(分支 4)	1. 四川北部的壤塘、若尔盖、马尔康、乡城、道孚 A、道孚 B、新龙、黑水 B、沙德、红原县、茂县 2. 青海省东南部的果洛、东北部的门源	北纬 28°34'~35°40'
Clade 5(分支 5)	西藏地区的林芝、林芝 2	北纬 29°59'
Clade 6(分支 6)	四川地区的雅江县	北纬 29°03'~30°30'

率,其数值区间为 0~0.01,数值越大,遗传多样性高。这种单倍型多样性高,核苷酸多样性低的情况,表明冬虫夏草菌群体曾经历过瓶颈效应后,伴随了迅速地种群扩张与变异的积累^[30]。

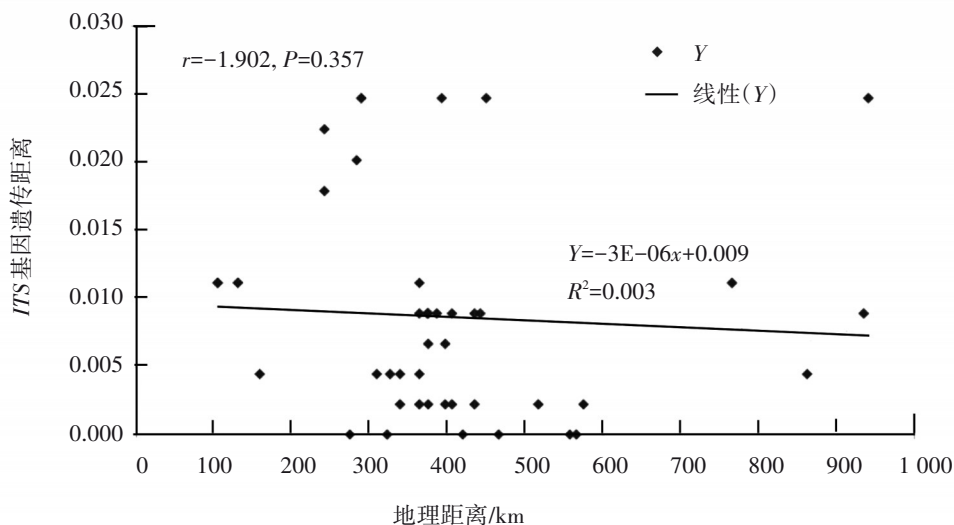
2.1.3 遗传距离与地理距离的关系

利用 MEGA 6.06 软件计算 45 条冬虫夏草菌 *ITS* 基因序列遗传距离,利用 GenAlEx 6.501 软件进行 Mantel test 统计学检验,对比分析冬虫夏草菌地理

距离与遗传距离间的相关性,结果显示无相关性($r=-1.902$, $P=0.357$),如图 2 所示。

2.1.4 分化时间

根据 Kasuga 等^[31]的真菌的基因替代速率标准,*ITS* 基因的替代速率为 0.001 替代数/位点/百万年前 (million years ago, Mya)。利用 MEGA 6.06 软件构建的系统发育树,并用 *ITS* 基因序列核苷酸替代率估算冬虫夏草菌的分化时间,结果如图 3 所示。

图 2 冬虫夏草菌体 *ITS* 基因序列遗传距离与地理距离相关性分析

Clade 6 与其他分支的分化开始于约 58.3 百万年前, Clade 1 出现在 48 百万年前, Clade 2 出现于 52 百万年前, 而其中分化时间最近, 是分支 5 可持续到 5 百

万年。Clade 3、Clade 4 分化时间接近, 均出现于 30 百万年前。推测冬虫夏草菌至少起源于 58.3 百万年前。

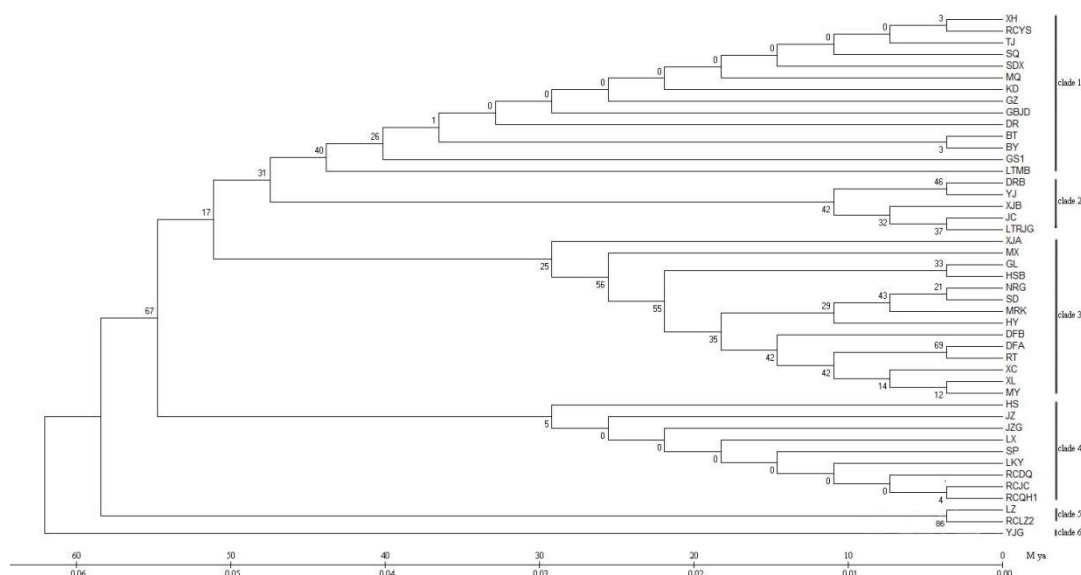


图 3 利用 ITS 基因对冬虫夏草菌各分支分化时间估算

2.2 COI 基因序列的系统发育学结果分析

本研究获得不同产地冬虫夏草寄主蝙蝠蛾 COI 基因序列 14 条, 长度在 1 700 bp 左右, 筛选 GenBank 中有可靠地理来源注释的 4 条蝙蝠蛾 COI 基因序列, 如表 5 所示。

2.2.1 系统发育树

表 5 来源于 Genbank 的相关序列信息

样品名称	来源地	登录号
KD2	四川省甘孜藏族自治州康定	KT834973.1
JX	江西	KJ632465.1
GX	广西	KT780172.1
BJ	北京	HM243593.1

进行多基因序列比对, 根据比对结果将序列剪切至 1 649 bp (包含 gap), 利用 MEGA 6.06 软件对 18 条序列进行多重比对, 计算序列间的 Kimura2 遗传距离, 获得遗传距离矩阵, 以遗传矩阵为基础采用最大释然法 (ML) 构建分子系统发育树, 用自展法 (bootstrap) 检验系统树, 自展数据集为 1 000 次, 如图 4 所示。

COI 基因系统发育树显示 18 条序列区分为 4 个不同的分支, 如表 6 所示。各分支样品所在地的纬度差异不大且有交叠情况, 表明蝠蛾遗传差异与纬度无关。

2.2.2 遗传多样性

利用 DnaSP 5.0 软件对 18 条蝙蝠蛾 COI 基因序列进行分析。结果显示, 在物种水平上, 所有冬虫夏草菌 ITS 基因序列有 18 个单倍型, $H_d=1.000$, 表明其遗传多样性高, 遗传资源丰富; 但 $P_i=0.00034$, 数值较小, 表明其遗传多样性低。在较大的地理区域出现这种高单倍型多样性 (H_d), 低核苷酸多样性 (P_i) 的情况, 推测可能是蝠蛾群体曾经历过瓶颈效应后, 伴随了迅速地种群扩张与变异的积累。

2.2.3 遗传距离与地理距离的关系

利用 MEGA 6.06 软件计算 18 条蝙蝠蛾 COI 基因序列遗传距离, 利用 GenAlEx 6.501 软件进行 Mantel test 统计学检验, 比较冬虫夏草菌地理距离与遗传距离间的相关性, 结果显示无相关性 ($r=-1.182, P=0.070$), 如图 5 所示。

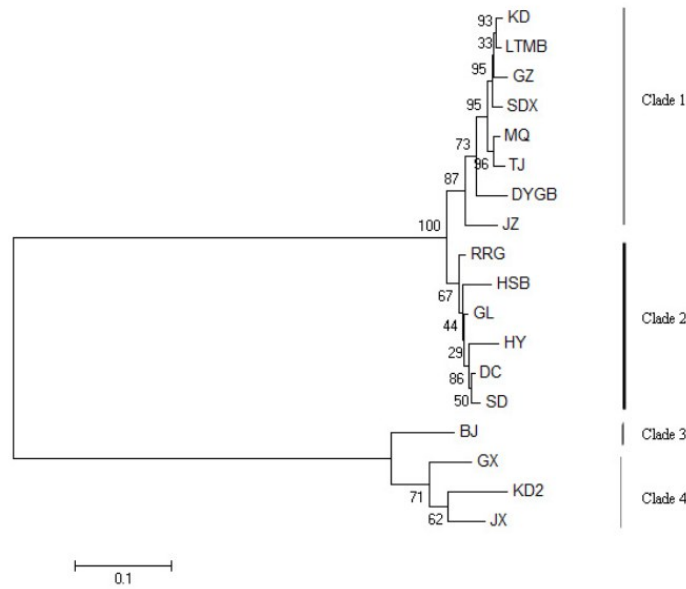


图 4 冬虫夏草寄主蝠蛾 COI 基因序列系统发育树

表 6 冬虫夏草寄主蝠蛾 COI 基因序列系统发育树分支及其样品所在地区

分支编号	分支包含样品所在地区	纬度跨度
Clade 1	1. 四川西部的甘孜、理塘、通江、沙德镇、九寨沟县、得荣县、康定市 2. 甘肃地区的玛曲	北纬 27°58'~34°20'
Clade 2	1. 四川北部的若尔盖、稻城、红原、黑水 B、沙德 2. 青海地区的果洛	北纬 27°58'~35°40'
Clade 3	北京	北纬 39°28'~41°05'
Clade 4	广西、江西和康定 2	北纬 20°54'~30°46'

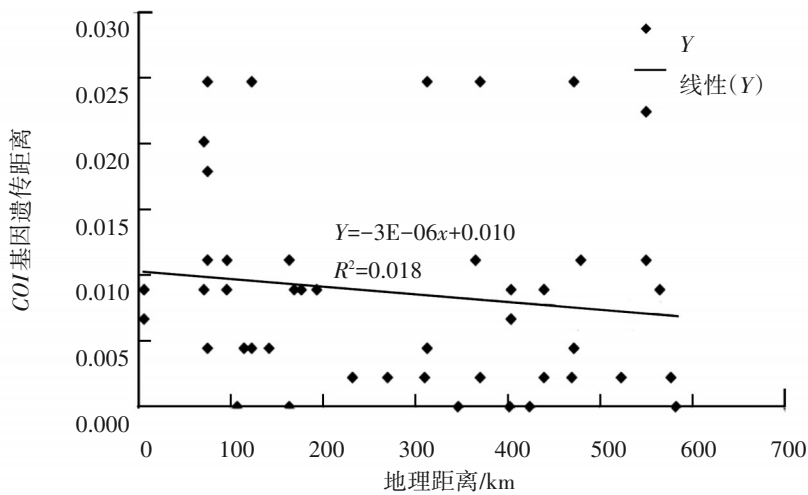


图 5 蝠蛾 COI 基因序列遗传距离与地理距离相关性分析

2.2.4 分化时间

参考 Brower^[32]对昆虫的基因替代速率标准, COI 基因的替代速率均为 0.011 5 替代数/位点/百万年前(Mya)。利用 MEGA 6.06 软件构建系统发育

树,并用 COI 基因序列核苷酸替代率估算冬虫夏草寄主蝠蛾的分化时间。Clade 1 与其他分支的分化开始于约 17.5 百万年前,Clade 2 出现在 14.8 百万年前,Clade 3 出现于 8.75 百万年前,而其中分化时间

最近,是Clade 4可持续到6百万年(图6)。推测冬虫夏草菌寄主蝙蝠蛾至少起源于17.5百万年前。

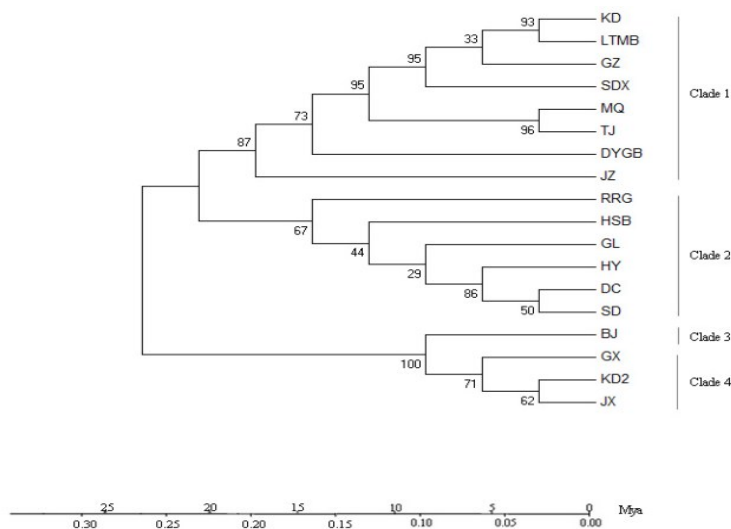


图6 利用COI对冬虫夏草寄主蝙蝠蛾各分支分化时间估算

3 讨论

本研究以四川产区为主的不同产区冬虫夏草样本为研究对象,探讨其遗传分化和变异特点。从ITS基因系统发育树和COI基因系统发育树结果显示,冬虫夏草菌及其寄主蝙蝠蛾具有丰富的遗传多样性,推测其在中国的主产区可能是冬虫夏草菌及其寄主蝙蝠蛾的起源之一。系统发育树分析表明,冬虫夏草各产区的分支情况与所处纬度存在交叠现象,二者并未表现出明显的一致性。而汪家春等^[15]在四川理塘、甘肃甘南、青海玉树、西藏那曲、西藏林芝等分别采集样本,分析不同地域的冬虫夏草rDNA ITS区的序列分析和遗传分化,结果发现位于不同海拔和纬度的西藏那曲与林芝所产冬虫夏草的遗传分化明显较高;而位于海拔和纬度相近的青海玉树与西藏那曲及四川理塘、甘肃甘南等产区的冬虫夏草基因序列遗传分化较低。本研究结果并不支持前人关于冬虫夏草遗传分化与纬度分布有关的研究结论^[33],但遗传分化是否与海拔有关,还需进一步研究。

袁峰^[34]发现,青藏高原地质活动造成并加剧了冬虫夏草居群的遗传分化,但遗传结构与地理距离

并不显著相关,表明冬虫夏草菌及寄主蝙蝠蛾的遗传差异并不是由地理隔离造成;冬虫夏草菌与寄主蝙蝠蛾的进化关系表现出显著的一致性,表明二者经历了显著的协同进化。本研究对冬虫夏草菌的ITS基因及其寄主蝙蝠蛾的COI基因遗传距离的研究发现,其与地理距离无相关性,且冬虫夏草菌进化时间至少起源于58.3百万年前(MyA)而寄主蝙蝠蛾可能起源于17.5百万年前,这一分化时间比对结果表明,冬虫夏草菌的分化时间明显早于寄主蝙蝠蛾,推测在冬虫夏草菌寄生寄主蝙蝠蛾之前可能以土生方式存在或者有另外的寄主,当冬虫夏草菌寄生寄主蝙蝠蛾后产生了两者的协同进化关系,从而促使了寄主蝙蝠蛾的多样性分化。这一研究结论与袁峰^[34]的发现一致。

张云武等^[35]发现云南省西北部相同地区的冬虫夏草样本遗传变异相对较小,不同地区的冬虫夏草样本存在较大的遗传变异;Chen等^[36]也发现青藏高原不同产区野生虫草间的遗传多样性存在很大不同。这些研究表明遗传变异和产地环境关系密切。但赵泽孝等^[37]从西藏那曲当年产风干冬虫夏草分离得到菌株C21,经研究发现,C21与源自各地的冬虫夏草子实体均具有极高的同源性,且西藏自

治区内不同地方虫草 *ITS* 基因序列差异很小,这一结果与张云武等^[35]的研究结果相矛盾。因此对冬虫夏草变异和分化研究的相关结论仍不很明确,尤其是冬虫夏草遗传分化与所处生境的关系受蝙蝠蛾种属影响的差异,本研究将进一步提高冬虫夏草菌采样样品数量和采样产区多样性开展进一步深入研究。

4 结论

通过构建并分析 *ITS* 基因序列和 *COI* 基因序列的系统发育树,发现纬度相近产区的冬虫夏草菌及其宿主蝙蝠蛾的遗传差异均不大;通过遗传多样性分析,发现冬虫夏草菌及其宿主蝙蝠蛾均表现出单

倍型多样性高,核苷酸多样性低的情况,表明冬虫夏草菌及其宿主蝙蝠蛾群体均曾经历过瓶颈效应后,伴随了迅速地种群扩张与变异的积累;遗传距离与地理距离相关性研究表明,冬虫夏草菌及其宿主蝙蝠蛾的遗传距离均表现出与地理距离无相关性;冬虫夏草菌及宿主蝙蝠蛾分化时间比对研究表明,冬虫夏草菌的分化时间明显早于寄主蝙蝠蛾,推测在冬虫夏草菌寄生寄主蝙蝠蛾之前可能以土生方式存在或者有另外的寄主,当冬虫夏草菌寄生寄主蝙蝠蛾后产生了协同进化关系,从而促使了寄主蝙蝠蛾的多样性分化。但冬虫夏草菌与其寄主蝙蝠蛾二者在遗传距离上是否有相关性还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 朱玉贤,李毅.现代分子生物学[M].北京:高等教育出版社,2002.
- [2] 杨倩倩,李志红,伍祎,等.线粒体 *COI* 基因在昆虫 DNA 条形码中的研究与应用[J].应用昆虫学报,2012,49(6):1687-1695.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2015:115.
- [4] 任朝辉.冬虫夏草微生态区系中真菌及 *PKS*、*NRPS* 基因的多样性研究[D].贵阳:贵州师范大学,2018.
- [5] 赵庆年.天然药物学[M].2版.南京:江苏科学技术出版社,2018:88.
- [6] 李典友.药用昆虫高效养殖与药材加工[M].郑州:河南科学技术出版社,2017:242.
- [7] 赵昆.冬虫夏草活性提取物虫草多糖配合有氧体育运动改善建议[J].中国食用菌,2019,38(2):42-45.
- [8] 周秋彤.冬虫夏草制剂对老年慢性阻塞性肺疾病患者免疫功能及肺功能的影响[D].济南:山东中医药大学,2021.
- [9] 赵逸,陈海盈,李舒丽,等.北冬虫夏草角鲨烯单氧酶基因的类胡萝卜素生物合成功能解析[J].现代食品科技,2021,37(9):37-42+278.
- [10] 蔡依珊.冬虫夏草对益肾调经膏治疗 POI 的增效作用研究[D].南京:南京中医药大学,2021.
- [11] 韩雪纯,张焯,栾军军,等.血管紧张素受体阻断剂联合冬虫夏草对肾小球肾炎临床疗效观察[J].现代生物医学进展,2020,20(15):2853-2857+2862.
- [12] 寇秋爱,夏立营,刘源才,等.冬虫夏草胶囊改善男性肾阳虚证及抗氧化功能临床研究[J].中国药物与临床,2020,20(3):454-456.
- [13] 周思琪,程雨馨,张兴彩.基于网络药理学和分子对接技术探讨冬虫夏草治疗特发性肺间质纤维化的作用机制[J].西部中医药,2024,37(5):90-96.
- [14] 陆焦焦.基于 DNA 条形码的冬虫夏草鉴别及产地溯源研究[D].扬州:扬州大学,2022.
- [15] 汪家春,徐军,李兆兰,等.不同地域的冬虫夏草 rDNA *ITS* 区的序列分析和遗传分化[J].天然产物研究与开发,2018,30(11):1963-1970.
- [16] 代永东.青藏高原东南部冬虫夏草及其近缘种分类与谱系地理研究[D].昆明:云南大学,2018.

- [17] 张宏越.一种冬虫夏草寄主昆虫线粒体基因组的测序及序列分析[D].太原:山西大学,2017.
- [18] 徐志鸿.越南线虫草属分类与系统发育研究[D].昆明:云南大学,2020.
- [19] 普春龙.分别基于ITS和COI序列探讨部分地区冬虫夏草菌及其寄主昆虫的遗传分化[D].昆明:云南大学,2016.
- [20] 邓小书,卫秋阳,谭发银,等.基于高通量测序的人工培植冬虫夏草僵虫颜色变化转录组分析[J].中国现代中药,2023,25(8):1635-1645.
- [21] 秦文平,李九平,李敏,等.甘肃关山产香棒虫草与冬虫夏草无机元素及重金属比较分析[J].甘肃科技,2021,37(5):80-82.
- [22] 程诺,潘菊华,王阶,等.冬虫夏草中砷含量分析的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(20):265-273.
- [23] 丘雪红,曹莉,韩日畴.冬虫夏草与产地植物及土壤的重金属含量测定[J].环境昆虫学报,2020,42(2):267-273.
- [24] 张众谋,康帅,左甜甜,等.冬虫夏草及其近缘品中铅、镉、砷污染评价及人体健康累积风险评估方法探索[J].中国现代中药,2024,26(1):80-87.
- [25] 杜玉杰,李劲涛,陈玉龙.微波消解-ICP-MS法测定冬虫夏草及生境土壤砷含量[J].四川农业科技,2024(1):68-72.
- [26] 马金梅,肖远灿,郜靓,等.仿生提取ICP-MS法测定冬虫夏草8种重金属含量及健康风险评估[J].中国野生植物资源,2024,43(3):20-27.
- [27] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. San Diego: Academic Press, 1990.
- [28] SIMON C, FRATI F, BECKENBACH A, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1994, 87:651-701.
- [29] SIMON C, BUCKLEY T R, FRATI F, et al. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA [J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2006, 37:545-579.
- [30] 李渊.冬虫夏草附加模式、分类学及遗传多样性的研究[D].太原:山西大学,2013.
- [31] KASUGA T, WHITE T J, TAYLOR J W. Estimation of nucleotide substitution rates in Eurotiomycete fungi [J]. Molecular Biology and Evolution, 2002, 19:2318-2324.
- [32] BROWER K J, BLOW F C, HILL E M. Risk factors for anabolic-androgenic steroid use in men [J]. Journal of Psychiatric Research, 1994, 28(4):369-80.
- [33] 王伟.青海省部分地区冬虫夏草遗传多样性RAPD分析[D].西宁:青海师范大学,2010.
- [34] 袁峰.冬虫夏草居群谱系地理与适生区分布研究[D].昆明:云南大学,2015.
- [35] 张云武,陈永久,沈发荣,等.滇西北地区冬虫夏草和阔孢虫草的遗传分化研究[J].菌物系统,1999,18(2):176-183.
- [36] CHEN Y J, ZHANG Y P, YANG Y X, et al. Genetic diversity and taxonomic implication of *Cordyceps sinensis* as revealed by RAPD markers [J]. Biochemical Genetics, 1999, 37:201-213.
- [37] 赵泽孝,崔晓龙,丛严广.西藏冬虫夏草无性型5.8S rDNA, ITS 间区系统发育分析[J].云南大学学报(自然科学版),2006(1):83-87.