

天然冬虫夏草多菌共存生物体分子异质性的 检验与讨论

朱佳石^{1,2*} 吴建勇^{1,3}

(¹香港理工大学应用生物与化学科技学系, 香港; ²清华大学深圳研究生院生命与健康科学学部, 深圳 518055;

³香港理工大学深圳中药药理学及分子药理学研究重点实验室, 深圳 518057)

摘要 中药冬虫夏草数百年来用于滋补保健、疾病防治和病后康复, 但有关冬虫夏草菌的学术争议一直没有停止。中国被毛孢是冬虫夏草菌的无性世代学说较为流行, 然而学界尚未获得证实这一学说的直接证据。部分间接证据来自于分子系统学微观和宏观研究。该文回顾了冬虫夏草分子系统学文献, 讨论了微观研究和宏观研究的实验方法、数据分析方法及其结果。冬虫夏草分子生物学微观研究不断获得新证据, 证明天然冬虫夏草基因组DNA的多元异质性, 揭示冬虫夏草中含有的多种真菌和多种突变基因型冬虫夏草菌, 证明冬虫夏草是多种真菌与蝙蝠蛾幼虫尸体构成的复杂的菌虫物种复合体。随着冬虫夏草的成熟, 在僵虫体和子座中多种菌物的差异存在巨大的、非同步的动态变化。宏观分子系统学研究的丰度加权算法揭示在僵虫体、子座和子囊果中分子标记多态性的高度差异及其在冬虫夏草成熟过程中的动态变化。这些分子系统学研究结果支持冬虫夏草是“一个统一微生态系统”的学说。

关键词 天然冬虫夏草; PCR扩增子异质性; 突变基因型冬虫夏草菌; 中国被毛孢; 蝙蝠蛾拟青霉; 微观和宏观分子系统学

Genetic Heterogeneity of Natural *Cordyceps sinensis* with Co-existence of Multiple Fungi

Zhu Jiashi^{1,2*}, Wu Jianyong^{1,3}

(¹Department of Applied Biological and Chemical Sciences, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong;

²Division of Life Sciences and Health, Tsinghua University Graduate School at Shenzhen, Shenzhen 518055, China;

³State Key Laboratory of Chinese Medicine and Molecular Pharmacology, Hong Kong Polytechnic University, Shenzhen 518057, China)

Abstract Natural *Cordyceps sinensis* is a precious traditional Chinese herb and has been used as a folk medicine for hundreds of years for promoting health, combating diseases and facilitating post-disease recovery. However, the debate on the anamorph-teleomorph connection for *Ophiocordyceps sinensis* fungus has been undergoing for decades. Direct evidence is still lacking for the hypothesis that *Hirsutella sinensis* is the sole anamorph of *O. sinensis*. Some indirect evidence was derived from molecular systematics studies using either microcosmic or macrocosmic techniques. This paper reviews the *C. sinensis* molecular systematics publications and discusses their experimental designs and methodologies, data analysis methods and the results. More and more new data from microcosmic molecular biology studies demonstrated the multiple genetic heterogeneity of the *C. sinensis* genomic DNA pool, indicating that natural *C. sinensis* contains multiple fungi and multiple genotypes

收稿日期: 2014-09-16 接受日期: 2014-11-17

*通讯作者。Tel: 010-58277090, E-mail: zhujosh@gmail.com

Received: September 16, 2014 Accepted: November 17, 2014

*Corresponding author. Tel: +86-10-58277090, E-mail: zhujosh@gmail.com

网络出版时间: 2015-01-23 10:10 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150123.1010.001.html>

of *O. sinensis*, forming a natural fungi-insect complex. The fungi that differentially exist in the caterpillar body, stroma and ascocarps of *C. sinensis* undergo dynamic, asynchronous alterations during *C. sinensis* maturation. Macrocosmic analyses with using density-weighted algorithms demonstrated the dramatic differences in the integral molecular marker polymorphism in the different compartments of *C. sinensis*, and the dynamic alterations of the molecular marker polymorphism during *C. sinensis* maturation. All these results from molecular systematics studies supported the hypothesis of an integrated micro-ecosystem for natural *C. sinensis*.

Keywords natural *Cordyceps sinensis*; PCR amplicon heterogeneity; mutant genotypes of *Ophiocordyceps sinensis*; *Hirsutella sinensis*; *Paecilomyces hepiali*; microcosmic and macrocosmic molecular systematics

天然冬虫夏草是一味阴阳双补的名贵中药,数百年来用于滋补保健、疾病防治和病后康复。现代药理学研究验证了冬虫夏草及其替代产品的疗效,特别是抗衰老功能^[1-4]。天然冬虫夏草菌虫物种复合体和纯化冬虫夏草菌使用同一拉丁名 *Cordyceps sinensis* (Berkeley) Saccardo^[5-6]。冬虫夏草菌已于2007年更名为 *Ophiocordyceps sinensis* (Berkeley)^[7],但它是单一真菌还是一组真菌的总称仍有争议。有文献描述中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 是冬虫夏草菌的唯一无性型^[5-6,8]。而 Barseghyan 等^[9]认为,中国弯颈霉和中国被毛孢同为冬虫夏草菌的无性型; GenBank 将多种突变基因型冬虫夏草菌均注释为 *O. sinensis*。在菌物、植物/中药分类学家就天然冬虫夏草的拉丁名达成共识之前,本文暂沿用天然冬虫夏草现在的拉丁名 *Cordyceps sinensis*。冬虫夏草产于青藏高原海拔 3 500 米以上的高山草甸和高山灌丛带^[1,10-11],具有复杂的生命周期。它的成熟状态与其药效效能相关,成为冬虫夏草药材质量分级的标准。

几十年来,有关冬虫夏草菌 *O. sinensis* 的学术争议一直未停。中国被毛孢是冬虫夏草菌的无性世代的学说广受尊重^[5-6,8,12]。但 Hu 等^[13]写道:“Attempts at cultivating the fungus to produce fruiting bodies have consistently failed.”迄今,学界尚未获得确定冬虫夏草无性型的直接证据,即严格按照科赫氏法则 (Koch's postulates) 完成冬虫夏草有性子实体人工诱发:经某种途径分离、纯化的菌株 (postulated anamorph 假定无性型) “经过人工培养或接种昆虫后能够形成冬虫夏草有性型子实体,产生子囊孢子,才可以确定其是冬虫夏草的正确无性型”^[6,9,12-18]。这一学说的间接证据主要来自:(1)真菌分离培养、纯化和产孢结构类型、分生孢子形态特征检验;(2)子囊孢子微循环产孢试验;(3)分子系统学的宏观和微观

研究^[5-6,8,12,14-16]。然而,自然界中多数真菌至今还不可培养,导致真菌分离培养、纯化和形态学检验以及全基因测序的困难。而子囊孢子微循环产孢研究亦受制于真菌分离培养的技术瓶颈,能否实现全部子囊孢子微循环产孢过程尚有疑问,尤其是对那些子囊孢子萌发和人工培养困难的真菌种^[14,19]。因此分子系统学研究就成为冬虫夏草菌物学的一个重要的辅助研究手段^[16]。分子生物学技术用于研究冬虫夏草尚属较年轻的跨学科分支,近 15 年来有了长足进展。

菌物学和分子系统学研究证明,冬虫夏草是多种真菌共存共生,与蝙蝠蛾幼虫尸体组成的菌虫物种复合体,从冬虫夏草中反复多次分离出涉及 13 个属的 22 种真菌^[6,9-11,14-16,20-30]。张永杰等^[25-26]报道了冬虫夏草中存在至少 37 个属的 90 多种可培养的真菌,以及更多不可培养的真菌形成冬虫夏草菌物群区系。另有研究揭示,冬虫夏草中存在至少 7 种突变基因型冬虫夏草菌 *O. sinensis*,它们在冬虫夏草的不同部位差异存在,其生物量随着冬虫夏草的成熟出现巨大的、非同步的动态变化^[10,20-24,27-29]。据此,梁宗琦等^[15]提出冬虫夏草是“一个统一微生态系统”的学说,以描述冬虫夏草作为一个整体,在其生长、成熟过程中的多菌共存共生的动态变化以及处在动态变化中的多种真菌所派生的所有化学成分作为其药理药效功能的基础,毕竟冬虫夏草最初发现是基于其药效功能^[1-4]。至于众多无性型菌中,哪个或哪些 (GenBank 列出多种) 是冬虫夏草菌的正确无性型,哪些菌参与协同侵染蝙蝠蛾幼虫、子座萌发和生长成熟、冬虫夏草菌从无性生长到有性生长的转变、搭建子囊及其支持结构以及子囊孢子的生成、成熟(或败育)和弹射(或不全弹射)^[30-32,39],诸如此类的问题留待菌物学相关研究来回答(本文虽有涉及,但不是本文主题)。

分子系统学研究方法主要有两类。第一类以RAPD(random amplified polymorphic DNA)分子标记多态性分析为代表,研究菌物之间的宏观、整体差异,分析样本间的整体相似度和聚类关系,也用于研究生物体之间的遗传距离,即相异度^[5,33-38]。此类研究方法还包括基于全基因组的限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、序列特异性扩增区域(sequence characterized amplified regions, SCAR)、酶切扩增多态性序列(cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS)、DNA扩增指纹谱(DNA amplified fingerprints, DAF)、简单序列重复分析(simple sequence repeat, SSR)和简单重复序列间区扩增分析(inter-simple sequence repeat, ISSR)等^[36-37]。

第二类分子系统学研究是微观比对编码核糖体RNA的nrDNA(nuclear ribosomal DNA)的内转录间隔区ITS(internal transcribed spacer)片段序列,据此确定菌物的系统分类学地位。随着第二代测序技术的推广,全基因组测序揭示了大量真菌分子信息^[13]。由于全基因组测序和分析程序复杂、专业性强、价格昂贵,用于物种间比较的常规研究尚有困难。GenBank中注册的为数不多的冬虫夏草相关菌物的全基因组分子信息有助于分析众多突变基因型序列。此外,ITS片段分子克隆、分子构象分析、限制性酶切分析、Southern印记杂交以及GenBank文库的生物信息学分析等也用于冬虫夏草的微观研究^[5,10-11,20,22-26,29,32,39]。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)质谱基因分型法用于鉴定特定位点的等位基因突变,发现了多种突变基因型冬虫夏草菌^[10,22,27-28,32,39]。

宏观和微观真菌分子系统学研究构成一个整体,互为补充。前者优于生物体宏观的整体分析,比较样本间的整体相似度和聚类关系,但不确定样本中单一菌物的分类学地位。而微观分子系统学研究根据ITS序列判断菌物的分类学地位。而对于冬虫夏草这一多菌共存的复杂生物体而言,ITS序列仅提示多菌共存生物体中的某个或某几个成分,若以ITS测序的结果延伸判断,则会导致“盲人摸象”式的争议。本文回顾微观和宏观分子系统学文献,分析其研究方法和实验结果。

1 冬虫夏草分子系统学微观研究中的特殊课题

十几年来,冬虫夏草的分子系统学微观研究从实验设计、实验方法的选择、样本产区和成熟期的选择、数据的处理、结果解释等方面已有了长足的进展。此类研究多为运用PCR等分子生物学技术,测定真菌的基因组DNA中具有种属特异性的DNA片段序列。有学者用nrDNA 18S片段测序鉴定冬虫夏草中的菌物^[40-41];但多数学者认为,ITS序列更具种属特异性,用以鉴定冬虫夏草中的多种菌物具有优势^[5,10-11,20-29,32,42-52]。我们首先回顾真菌分子系统学微观研究中的特殊课题。

1.1 天然冬虫夏草ITS片段扩增子的多元异质性

1999年以来,有多篇冬虫夏草ITS片段测序论文发表。早期研究(冬虫夏草样本的采集时间和成熟状态不详)只检出中国被毛孢序列,从而推断中国被毛孢是冬虫夏草菌的无性世代^[5,42-48]。但这一推断值得商榷:既然学者们从冬虫夏草中分离出众多真菌,那么如果应用通用引物,天然冬虫夏草的ITS扩增子是否应具有多元异质性?

通用引物PCR扩增子测序时最容易检出的序列是扩增子中优势存在的DNA组分。然而这些组分不一定来源于冬虫夏草中的优势菌基因组DNA,而是指数性扩增时扩增效率最高的真菌DNA组分,其结构中没有可以导致测序失败的DNA高级结构-构象。影响PCR扩增效率的因素包括:(1)冬虫夏草所含多种菌物在不同部位的差异存在和表达、各菌的生物量在冬虫夏草不同成熟期出现不同步的动态变化导致PCR模板拷贝数的多寡;(2)所用引物与不同真菌DNA模板序列的同源性的差异;(3)真菌基因组中可能存在数量不等的重复序列,导致各个真菌基因组中目的序列的模板拷贝数的差异;(4)某些真菌基因组DNA非转录区可能存在DNA高级结构-构象,影响引物与模板的结合或序列延伸,或导致延伸跳跃,致使扩增子长度在目标条带的分子量范围之外而被忽略;(5)PCR扩增子可能形成DNA高级结构-构象,影响测序;(6)PCR扩增子可能有多种DNA组分,但测序时仅获得一条序列而忽略对扩增子条带的多元异质性的判断等。

2004年后的文献分别报道了采用克隆-测序、真菌特异性引物PCR、巢式嵌套法PCR、“touch-down”PCR、真菌特异性探针Southern印记杂交和

限制性酶切扩增子RFLP分析等分子生物学技术, 陆续从冬虫夏草僵虫体和子座的ITS扩增子中检出中国弯颈霉、蝙蝠蛾拟青霉、玫红假裸囊菌和其他真菌序列^[10-11,21,23,29,49-51]。张永杰等^[25-26]采用ITS扩增子克隆加单链构象分析(single-strand conformation polymorphism, SSCP), 从西藏和四川采集的冬虫夏草(样本采集时间和成熟状态不详)菌膜、菌核和子座的ITS片段扩增子中检出至少37个属的90多种真菌的ITS序列和大量不可培养的真菌序列。Stensrud等^[20]报道2007年以前GenBank文库中注册的3组冬虫夏草菌序列以后, 学者们采用了克隆-测序法或MassARRAY SNP质谱基因分型法从青海化隆和四川康定采集(5月至6月采集)的冬虫夏草子座和僵虫体的ITS扩增子中检出至少7种冬虫夏草菌突变基因型, 包括5个转换点突变基因型(2个GC偏倚基因型, 3个AT偏倚基因型)和至少2个未知序列颠换点突变基因型^[10,22-24,27-29,32]。GenBank中注册的多组转换点突变冬虫夏草菌序列均注释为*Cordyceps sinensis*(旧名)或*Ophiocordyceps sinensis*(2007年后的更新名)^[7,20]。除了与AB067721序列有高同源性($\geq 97\%$)的众多GC偏倚型注册序列外, 还有具有共同遗传学祖先的3组*O. sinensis*转换点突变AT偏倚型序列(图1): (1)与AB067740序列有高同源性($\geq 97\%$)的19个序列(AB067739、AB067740、GU233806、JQ753314、JQ900171、JQ900172、JQ900177、JQ900179、JQ900180、KC305881、KC305882、KC305883、KC305884、KC305886、KC305887、KC305888、KC305889、KC305890和KJ729098); (2)与AB067744序列有高同源性(99%)的12个序列(AB067741、AB067742、AB067743、AB067744、AB067745、AB067746、AB067747、AB067748、AB067749、AJ786590、KC305891和KC305892); (3)EU555436和KJ720572, 同源性98%^[20,32]。Fast Minimum Evolution(pairwise alignment)聚类分析构建的进化树图呈现两个聚类大群: AT偏倚基因型序列群(AT群)和GC偏倚型序列群(GC群)(图2)。GC群内遗传距离小; 还可见其他菌汇于此群, 它们与GC群*O. sinensis*之间的遗传距离明显小于AT群与GC群之间的距离, 如*Trichoderma harzianum* KJ175255(图2)^[52]。而AT群内呈现几个分枝: AT-bias(B)和AT-bias(C)形成聚类小群; 再与AT-bias(A)分枝汇合形成AT群。AT-bias(B)分枝内的序列同源

性达97%以上, 但仍形成2个分枝: AT-bias(B1)和AT-bias(B2)。GC偏倚型菌ITS1-5.8S-ITS2片段序列与AT偏倚型序列比对, 相似度仅有86%~89%, 具有明显的种属差异^[10,20]。三组AT偏倚型冬虫夏草菌(以AB067740、AB067744和EU555436为代表)ITS1-5.8S-ITS2序列的相似度为90%~94%; 其中, 5.8S片段序列与AB067721为代表的GC偏倚型菌和其他大量真菌比较, 相似度仅有86%~88%, 超出了物种科、属(genera and family)水平的正常变异^[20]。而不同种的真菌间(如中国被毛孢和蝙蝠蛾拟青霉)的5.8S片段序列相似度却高达98%(尽管它们的ITS1和ITS2序列相似度 $\leq 72\%$), 证明5.8S片段序列遗传进化的保守性^[10,20,24,27]。上述分析表明, 通用引物PCR所获得的冬虫夏草ITS片段扩增子具有多元异质性, 验证了菌物学研究从冬虫夏草中培养、鉴定出多种真菌, 也鉴定出多种目前尚无法培养的真菌种。这些分子系统学微观研究的结果支持梁宗琦等^[15]提出的冬虫夏草是“一个统一微生态系统”的学说, 却不支持中国被毛孢是冬虫夏草菌的唯一无性世代学说^[5-6]; 也警示这一扩增子多元分子异质性在真菌条形码的研究中应受到重视, 以保证条形码的构成如实反映冬虫夏草多物种复合体的整体。

毛雄民等^[53]报道不同产地冬虫夏草(采集时间和成熟状态不详)僵虫体组织培养物ITS序列多样性, 伴有分生孢子形态差异。云南德钦冬虫夏草菌无性型的分生孢子较大, 为AT偏倚型AB067744基因型菌; 而西藏当雄、青海果洛和四川康定冬虫夏草菌分生孢子依次显著性减小, 为AT型GU233806基因型(即AB067740型)菌。他们未检出GC偏倚基因型中国被毛孢ITS序列, 也未研究同株子座的基因型。学界期待这些形态不同的分生孢子的单孢子培养和系统学鉴定。该文还报道无性型菌丝“H”形融合。这一“H”形融合是否与真菌生殖过程有关, 其AT偏倚的基因型属性与文献报道的GC偏倚基因型冬虫夏草菌的“同宗交配”学说有什么生物学关系, 有待深入研究^[13,53-55]。

1.2 ITS片段扩增子中共存的多种冬虫夏草菌的相对比例

基于冬虫夏草ITS片段序列的分子异质性, 我们应用中国被毛孢特异性引物PCR获得ITS扩增子(~440 bp)^[10,29]。GC偏倚基因型中国被毛孢(AB067721为代表)在294~299碱基对位置为EcoR I酶切位点(图

```

1
AB067721 (1) TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACCAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTATCGAGTACCACCTCCCAAACCCCTCGGAACACCACAGCAGT
AB067744 (1) -----C-----A-A-T-----T-----T-----T-----GCG-C-C-C-----
Ab067740 (1) -A-----T-----A-A-T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
EU555436 (1) -----T-----T-----T-----
Consensus (1) GGAAGTAAAAGTCGTAA AAGTCTCCGTT GT AAC AGCGGAGGGAT ATTATCGAGT ACCACTCCTAAACCCCT CGAATACTATAGCAGT

101
AB067721 (101) TGCGTCGGGGGACCGCCCGCGGCCCGCCAGGGCCGCGCCGCGGAGGACCGCCAGACCCCTCGTGTGGCAGTGGCATCTCTCAGTCAAGAA
AB067744 (97) -----CG-----CG-----CT-G-----T-GG-----TT-----A-CGT---A-C-----T-T-----
Ab067740 (101) -----TA-----TA-----CT-A-----T-AA-----TT-----A-TAT---A-T-----T-T-----
EU555436 (15) -----TA-----TA-----CT-A-----T-GG-----TT-----A-CGT---A-T-----T-T-----
Consensus (101) TGCGTTAGCGGGACCGCCCTAGCGCCCTAAGGCCGGACTAGGGCCCGCGGAGGACCCCTAGACCCCTCCTATCGTAGTAGTATCTCTTAGTTAAGAA

201
AB067721 (201) GCAAGCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACCGAGCGAAATCGGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
AB067744 (197) -----A-T-----T-T-----A-T-A---TA-A-G---C-CG---A-G-----G-A---GT---T-----
Ab067740 (201) -----A-T-----T-C-----A-C-A---TA-A-A---C-CG---G-A-----A-A---AC---T-----
EU555436 (115) -----A-T-----T-C-----A-C-A---CG-A-G---T-TA---G-G-----A-A---AC---T-----
Consensus (201) GCAAGCAAATAAATAAAACCTTTAAACAACGGATCTCTTAGTCTAGCATCGATAAAGAACCGAGCGAAATCGGATAAGTAATATAAATTACAGAATTTA

301
AB067721 (301) GTGAACCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCACTCTGGCGGGCATGCCTGTCGGAGCGTCATCTCAACCCCTCGAGCCCCCGCTCGCGG
AB067744 (297) -A-T-----A---T-T-C-A-----T-----A-----G-----T-C-T---C-TA-----CG---
Ab067740 (301) -A-T-----A---C-T-T-A-----T-----A-----A-----A-----T-T-T---C-CG-----CG---
EU555436 (215) -A-A-C-----A---T-T-T-A-----T-----A-----G-----T-T-T---C-CG-----TA---
Consensus (301) GTAAACCATCGAATCTTAAACGTATATTACGCCCGCTAGCACTCTAGCGGGCATGCCTGTCGGAGCGTTATCTTAAACCCCTCGAGCCCCCGCTCGCGG

401
AB067721 (401) CGCGGGGGCCCGCCTTGGGGGTACCGCCCGCCGCCCTAAACGCAGTGGCGACCCCGCGCGGCTCCCTCGCGAGTAGCTCGTGAGAACCCTC
AB067744 (397) -----C-----A---C-----A-----C---C-A-T---C-CG-----ACGCAA---TA-TA-----
Ab067740 (401) -----T-----A---T-----G-----T-----T---A-C---C---CG-----ACGTGG---CA-CG-----
EU555436 (315) -----T-----A---T-----G-----T-----C---A-C---T---TA-----ATATAG---TA-CG-----
Consensus (401) CGCGGGGGC CGCCCTTAGGGGT ACGGCCCGCCGCCGCCCT AAACGCAGTAGCGACCCCGCGCGGCTCCCTACG AGTAGT AC GAGAACCCTC

501
AB067721 (501) GCACCGGGAGCGCGGAGCGGTACGCGCTGAAACCACCACCCCTCCAGTTGACCTCGGATCAGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA
AB067744 (497) -----TA-G---G-----GG-C-----A-AA---A-TATA-C---CTG---A-----T-----A-----C-----
Ab067740 (501) -----CG-A---G-----GG-C-----A-AA---T-TAGG---T-TTA---A-----T-----A-----T-----
EU555436 (415) -----CG-A---A-----TA-A-----T-CG---T-CTAG---
Consensus (501) GCACCGG AGCGGGAGCGGTACGCGCTGAAACCACCACCCCTCCAGTTGACCTCGGATCAGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA

601
AB067721 (601) GCGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTT
AB067744 (597) -----
Ab067740 (601) -----T-T-----TT-----A-----T-T-----T-----AAAATCTAGCCCCCTACG
EU555436 (467) -----
Consensus (601) GCGGAGGA

686

```

AB067721代表GC偏倚基因型冬虫夏草菌中的一组(含中国被毛孢)。AB067744、AB067740和EU555436代表3组AT偏倚基因型冬虫夏草菌序列。“-”代表相同碱基,空格代表不相配的序列间隔。

AB067721 represents one group of GC-biased *O. sinensis* genotypes (including *H. sinensis*). AB067744, Ab067740 and EU555436 represent the 3 groups of AT-biased *O. sinensis* genotypes. Hyphens indicate identical bases, and spaces denote unmatched sequence gaps.

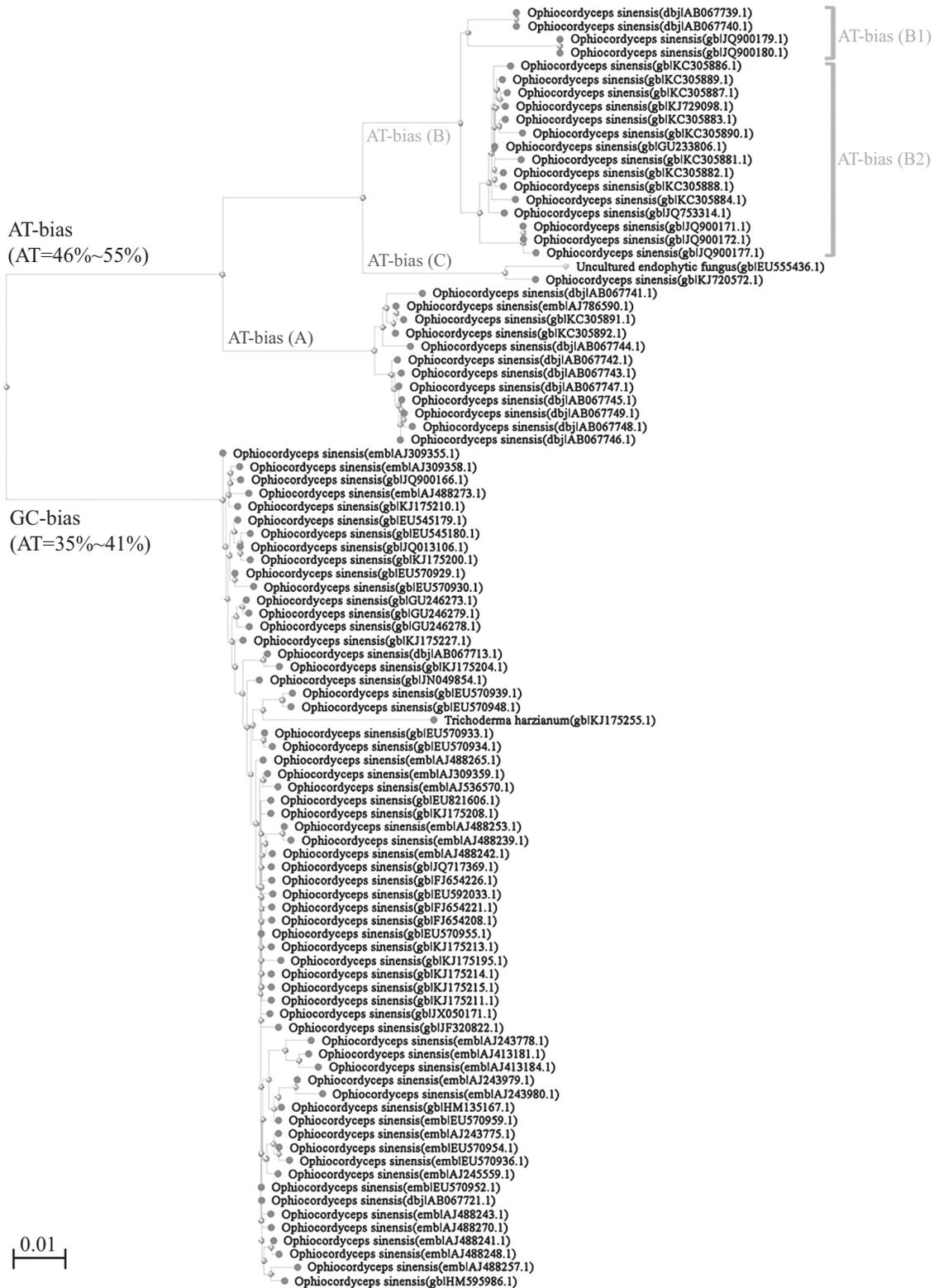
图1 4组突变基因型冬虫夏草菌ITS序列比对

Fig.1 Alignment of 4 groups of mutant *O. sinensis* ITS sequences

1)。由于299位点C→T点突变,AT偏倚基因型冬虫夏草菌失去了这个*EcoR* I酶切点。扩增子RFLP检验发现,经过PCR指数性扩增,于5月中旬在四川康定地区采集的未成熟子座样本(子座长度1~2 cm)中仅有极少量的440 bp扩增子可被*EcoR* I酶解(GC偏倚型中国被毛孢);而不被*EcoR* I酶解的AT偏倚基因型菌占绝对优势。随着冬虫夏草的成熟(成熟中冬虫夏草:6月初采集,子座长度3.5~4.5 cm,没有形成子座顶端的膨大的子囊果;成熟冬虫夏草:6月末采集,子座长度>5 cm,子座顶端膨大形成子囊果),对*EcoR* I敏感的GC偏倚型中国被毛孢的菌量逐渐增加^[10,29]。

为了排除扩增子RFLP检验经指数性扩增导致扩增子中各个真菌生物量天然比例的变化,我们应用Southern印记杂交法定量分析四川康定地区采集的天然冬虫夏草基因组中两组突变基因型冬虫夏草菌的相对比例。冬虫夏草全基因组DNA经*EcoR* I

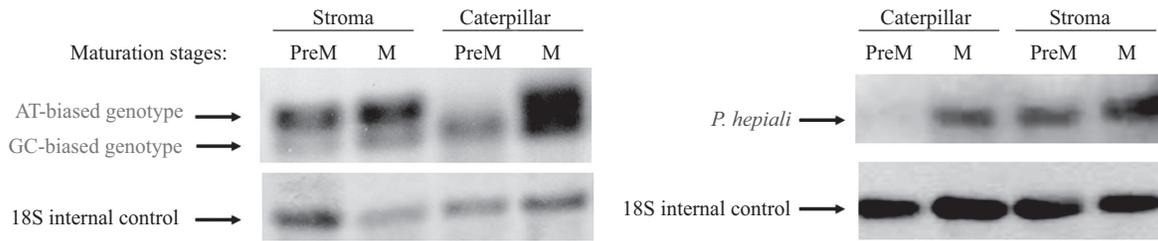
预处理后,应用真菌特异性探针(按GC偏倚型中国被毛孢和蝙蝠蛾拟青霉序列设计)进行Southern印记杂交^[10,29]。我们发现,蝙蝠蛾拟青霉、GC偏倚型中国被毛孢和AT偏倚型冬虫夏草菌的rDNA片段共存于冬虫夏草全基因组中,在冬虫夏草子座和僵虫体中差异存在,其生物量随着冬虫夏草的成熟呈现大幅度的、非同步的动态变化(图3)。图3左图显示5月中旬从四川康定地区采集的未成熟冬虫夏草子座(子座长度1~2 cm)中AT偏倚型冬虫夏草菌占绝对优势,在僵虫体中几乎没有;而GC偏倚型中国被毛孢则相反。随着冬虫夏草的成熟(成熟冬虫夏草样本于6月末采集,子座长度>5 cm,子座顶端膨大,形成子囊果),GC偏倚型菌在子座中逐渐增加,但其总量远低于AT偏倚型冬虫夏草菌,始终不是子座中的优势成分;而AT偏倚型菌则在僵虫体中大量增加,其丰度与GC偏倚型菌相当,考虑到探针与GC偏倚型



应用NCBI GenBank BLAST提供的Fast Minimum Evolution(pairwise alignment)算法。上方为AT偏倚基因型冬虫夏草菌群,由3个分枝组成: AT-bias(A)、AT-bias(B)和AT-bias(C)。AT-bias(B)分枝又由AT-bias(B1)和AT-bias(B2)两个分叶汇集构成。下方为GC偏倚基因型冬虫夏草菌序列群。Analyzed using Fast Minimum Evolution (pairwise alignment) algorithm provided by NCBI GenBank BLAST. The upper part shows the cluster of the AT-biased genotypes of *O. sinensis*, branching to 3 clades: AB-bias (A), AT-bias (B) and AT-bias (C). Clade AT-bias (B) is comprised of 2 leaves, AT-bias (B1) and AT-bias (B2). The lower part shows the cluster of the GC-biased genotypes of *O. sinensis*.

图2 冬虫夏草突变基因型菌ITS序列的遗传进化关系

Fig.2 Phylogenetic relationship of mutant *O. sinensis* ITS sequences



左图上图: 应用中国被毛孢特异性探针杂交; 右图上图: 应用蝙蝠蛾拟青霉特异性探针杂交; 左、右两图下图: 应用非特异性18S内控探针杂交。PreM表示未成熟冬虫夏草; M表示成熟冬虫夏草。

Upper-left panel: hybridized with the *H. sinensis*-specific probe; Upper-right panel: hybridized with the *P. hepiali*-specific probe. Both Lower-right and Lower-left panels: hybridized with the nonspecific 18S internal control probe. PreM refers to premature *C. sinensis*; M refers to mature *C. sinensis*.

图3 Southern印记杂交分析冬虫夏草成熟过程中冬虫夏草菌rDNA在子座和僵虫体中生物量的变化

(参考文献[10], 经过American Journal of Biomedical Science许可)

Fig.3 Southern blots of *O. sinensis* rDNA in the stroma and caterpillar body of *C. sinensis* during its maturation (reference [10], with permission from American Journal of Biomedical Science)

菌序列的相似性更高, 成熟僵虫体中AT偏倚型菌的实际生物量应该高于GC偏倚型菌。蝙蝠蛾拟青霉在冬虫夏草各个部位基因组中的生物量变化趋势与AT偏倚型冬虫夏草菌相似(图3右图), 提示迄今尚无法人工培养的AT偏倚型冬虫夏草菌可能具有常温菌的特征。扩增子RFLP检验、Southern杂交检验和SNP质谱分型检验均发现, 在冬虫夏草的成熟过程中, 数个真菌和突变基因型冬虫夏草菌在僵虫体、子座和子囊果部位的菌物差异表达出现动态的、非同步的变化^[10,21-24,27-29,32]。从实验角度来看, 子座中绝对优势存在的AT偏倚型冬虫夏草菌ITS扩增子呈现低测序成功率和低克隆率, 提示其基因组DNA的ITS片段或邻近区域存在DNA高级结构-构象影响PCR, 或其ITS扩增子可能形成DNA高级结构-构象影响测序和克隆^[24,27]。冬虫夏草成熟过程中多菌种在不同部位的大幅度的、非同步动态变化也提请学界注意冬虫夏草条形码构成成分的量的动态变化。

1.3 中国被毛孢全基因组测序

Hu等^[13]报道了中国被毛孢Co18分离株全基因组测序结果。此前, 该组曾尝试进行天然冬虫夏草全基因组测序^[56]。由于天然冬虫夏草中共存的多种突变基因型冬虫夏草菌序列中存在大量散在的转换或颠换点突变, 也存在其他多种真菌序列, 导致天然冬虫夏草全基因组测序时序列拼接困难(已在会议中交流), 因此该组将其研究策略从天然冬虫夏草全基因组测序改为对纯化的GC偏倚基因型中国被毛孢基因组测序^[13,56]。基于冬虫夏草全基因组测序时序列拼接困难导致研究策略的转变佐证了天然冬虫夏草全基因组DNA的多元异质性, GC偏倚型中国

被毛孢序列只是冬虫夏草全基因组中的一小部分。该文提交的序列(ANOV00000000)^[13]中并不包含GenBank收录的多种AT-偏倚基因型冬虫夏草菌ITS片段序列(下文详述)。

1.4 冬虫夏草的编码基因和蛋白组学研究

Hu等^[13]检测单一GC偏倚型中国被毛孢Co18分离株(文中未详述该分离株来自于哪个产区的冬虫夏草)的全基因组序列时发现了6 972个蛋白编码基因。而Xiang等^[57]检测四川康定地区购买的(采集季节和成熟状态不详)冬虫夏草菌虫物种复合体的转录组时发现了34 289个表达的特异编码基因序列(包括17 230独立子和17 059重叠群), 其中26 328个有基因注释, 7 961个没有注释。Hu等^[13]报道, 应用InterProScan软件分析全基因组序列, 确定了2 229个表达的和表达的蛋白基因。而Xiang等^[57]报道, 应用InterPro法分析转录组序列, 确定了7 229个表达的、具有功能注释的特异序列。由此可见, 天然冬虫夏草转录组表达的基因^[57]数倍于纯化的单一基因型冬虫夏草菌的全基因组编码的(包括不表达的)基因总数^[13], 这些组学结果比较提示, 天然冬虫夏草中多菌共存。另一项冬虫夏草全蛋白组多态性研究发现, 在冬虫夏草的成熟过程中冬虫夏草(样本购于四川康定地区; 未成熟样本子座长度1~2 cm; 成熟样本子座长度>5 cm, 形成子座顶端膨大的子囊果)全蛋白组多态性在僵虫体和子座出现巨大的、非同步的动态变化^[58]。虽然Xiang等^[57]的论文中未记载所测样本的成熟状态, 但全蛋白组多态性研究^[58]提示, 同一产区的冬虫夏草的成熟过程中可能存在复杂的全转录组编码基因表达或沉寂的大幅度的动态变化。

这有待于通过全基因组、全转录组和全蛋白组的同步比较研究来进一步证实。这些结果支持冬虫夏草是多菌共存的天然菌虫物种复合体。不同成熟期在子座和僵虫体中呈现动态变化的核酸成分、蛋白质和小分子化合物连同脂质、多糖等成分,构成了冬虫夏草全部药理功能的物质基础,也导致其药效效能出现动态变化,毕竟冬虫夏草的最初发现是基于其外观和药效功能,而且它的成熟状态是冬虫夏草药材的质量分级标准^[1-4,10,15,21-24,27-29,33]。

1.5 冬虫夏草中多菌种和多种突变基因型ITS片段序列代表独立的真菌

冬虫夏草ITS片段扩增子的多元异质性引发诸多疑问:可能在遗传进化中具有共同祖先的多种突变基因型是否共存于中国被毛孢基因组中^[13,20]? 它们的ITS序列是否是中国被毛孢基因组DNA中“失活”的伪基因(pseudogenes, 又称假基因、拟基因)^[59]?

Hu等^[13]报道,中国被毛孢Co18菌株全基因组序列ANOV00000000中存在143个非加工复制伪基因(duplicated pseudogenes),111个加工复制的返座伪基因(retrotransposed pseudogenes)和856个碎片残骸伪基因(fragmented pseudogenes);但该文未检出其他转换和颠换突变基因型ITS序列。从ANOV00000000^[13]序列中搜索GC偏倚型冬虫夏草菌ITS序列,仅在其中一个片段(KE659721)查到一段99%同源性的序列。而3个已知AT偏倚型冬虫夏草菌ITS序列(以AB067740、AB067744和EU555436为代表)与该片段仅有86%~89%同源性,未发现ANOV00000000中含有其他高同源性片段,提示这些AT偏倚型ITS序列独立于GC偏倚型冬虫夏草菌全基因组之外。克隆ITS扩增子检测数个纯化的中国被毛孢菌株时未测出其他突变基因型序列^[39]。与Xiao等^[24]的判断相同,提示这些点突变基因型冬虫夏草菌可能属于独立的真菌,将其ITS序列解释为GC偏倚型中国被毛孢全基因组中的伪基因尚无实验依据。Li等^[59]报道,GC型中国被毛孢序列与AT-bias(B2)型序列(图2)共存于单子囊孢子培养物中;而该培养物与无性型中国被毛孢Co18株的区别有待甄别。同时,该研究证实,未检出AT-bias(B2)基因型以外的其他转换和颠换点突变基因型序列,提示这些基因型序列独立于单子囊孢子基因组之外。需要注意的是,中国被毛孢全基因组测序时获得了该菌株基因组88.7%的序列^[13],仍有11.3%的DNA序列缺

失。这一现象在解码人类全基因组时也常在DNA非转录区遇到DNA高级结构-构象的困扰,造成某些DNA片段测序失败。能否从缺失的序列中找到突变基因型冬虫夏草菌ITS序列,能否找到多种突变基因型序列是GC型中国被毛孢基因组的“伪基因”的证据,学界将翘首以待。

多种突变基因型冬虫夏草菌ITS片段的生物量在冬虫夏草不同部位以及在冬虫夏草成熟的数周时间内出现非同步的大幅度动态变化,有些突变基因型ITS片段的生物量随着冬虫夏草的成熟而上升,有些则下降甚至消失^[10,22-24,28-29]。这些转换和颠换点突变基因型菌在短时间内出现非同步的动态变化,不支持它们共存于同一个纯化的无性型单菌种基因组中,也不符合孟德尔定律。而合理的解释是:这些转换突变和颠换突变基因型ITS序列存在于GC偏倚基因型中国被毛孢之外的独立的无性型真菌基因组中,随着各个内生菌物的增殖、降解和其他生物学过程出现菌物表达的非同步的动态变化。

1.6 蝙蝠蛾拟青霉和中国被毛孢天然复合菌种

Li等^[39]通过测定ITS序列发现,蝙蝠蛾拟青霉和中国被毛孢以天然菌种复合体的形式存在于蝙蝠蛾(*Hepialus armoricanus*)幼虫活体肠道中。他们从蝙蝠蛾幼虫肠道分离出两株菌——CH1和CH2,这两株菌对蝙蝠蛾幼虫的侵染效能是纯化的中国被毛孢菌株的39倍之多。镜下观察这两株菌的形态是中国被毛孢,但应用真菌特异性引物进行PCR测序和克隆测序,检出蝙蝠蛾拟青霉和中国被毛孢ITS片段序列;经多次固态↔液态培养,培养物呈现中国被毛孢低温菌缓慢生长特征和常温菌蝙蝠蛾拟青霉快速生长特征,说明蝙蝠蛾拟青霉和中国被毛孢ITS片段序列在CH1和CH2菌株中的共存并非代表真菌间的DNA片段漂移,而是以真菌活菌复合体的形式天然共存于蝙蝠蛾幼虫活体肠道中。Li等^[39]进一步应用SNP质谱基因分型法检验ITS片段序列,从这两个复合菌种中检出了多个转换点突变和颠换点突变冬虫夏草菌基因型。与此同时,他们检验了其他学者分离、纯化的数株中国被毛孢菌株,也同样检出了蝙蝠蛾拟青霉和中国被毛孢ITS片段序列。由于蝙蝠蛾拟青霉和中国被毛孢是以可分离的活菌形式共存于CH1和CH2菌种复合体中,且它们的ITS序列可以分别从菌种复合体中和“纯化”的中国被毛孢菌株中测出,这些研究结果不支持冬虫夏草菌具有共无性

型形态(dimorphism), 不支持同一真菌(物种)表现两种形态的假想。

1.7 蝙蝠蛾拟青霉和多种突变基因型冬虫夏草菌ITS序列共存于冬虫夏草子囊果和子囊孢子

我们在研究冬虫夏草子囊果和子囊孢子时检出蝙蝠蛾拟青霉和GC偏倚型冬虫夏草菌(中国被毛孢)ITS序列共存于自然弹射的和半弹射的、挂于子囊壳外的两类子囊孢子以及子囊果中^[32]。应用特异性引物PCR直接测序、克隆测序及SNP质谱基因分型技术, 我们检出多个转换点突变(GC偏倚基因型和3种AT偏倚基因型)和未知序列的颠换点突变冬虫夏草菌基因型, 提示蝙蝠蛾拟青霉和数个突变基因型冬虫夏草菌(包括GC偏倚型中国被毛孢)天然共存于冬虫夏草子囊孢子和子囊果。Li等^[59]也报道, AT-bias(B2)基因型和GC偏倚基因型序列并存于单子囊孢子培养物中。这些结果, 加上冬虫夏草子囊孢子相关真菌的培养技术尚未完全解决, 引发学者们质疑在现有技术条件下进行的冬虫夏草子囊孢子微循环产孢试验能否模拟、实现在天然条件下的全部个体发育生物学过程^[14,19], 也渴望获知子囊孢子和分生孢子微循环产孢所产生的、形态相异的分生孢子的基因型是否相同^[12]。

以上综述了天然冬虫夏草的分子系统学微观研究的一些特殊学术课题。虽然分子系统学微观研究可通过测序判断受检样本的分类学地位, 但其结果却无法反映天然冬虫夏草这一多菌共存的菌虫物种复合体的整体, 无法进行样本间的整体差异比较, 而宏观分子系统学研究可以弥补这一不足。

2 冬虫夏草分子系统学的宏观整体研究——分子标记多态性的比较

PCR扩增子多态性的宏观、整体差异分析也用于研究冬虫夏草, 与微观研究互补, 构成了冬虫夏草分子系统学研究的整体。针对前述天然冬虫夏草ITS片段扩增子高度异质性的复杂遗传背景, 为了避免仅以微观研究的结果得出“盲人摸象”式的推论和学术争议, 学者们应用分子标记多态性的宏观分析方法比较样本间的整体差异^[36-37], 其中RAPD分子标记多态性分析法在冬虫夏草的研究中应用得最多。例如, 魏鑫丽等^[5]根据RAPD多态性研究结果, 加上微观的ITS测序结果, 推断中国被毛孢是冬虫夏草无性型。下文以RAPD分子标记多态性研究为例, 分析

文献报道的宏观整体研究的实验设计、方法和结果。

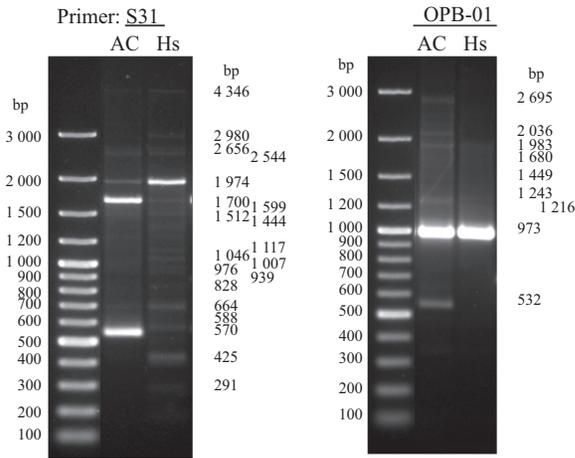
2.1 随机引物的选择

RAPD分子标记多态性研究应用随机引物PCR, 根据扩增子在琼脂糖凝胶电泳中的泳动速率和丰度计算相似度及构建系统聚类树图。该法应用单引物扩增, 不同引物的RAPD多态性图形迥异。样本间RAPD图形的差异反映因DNA模板序列不同产生DNA扩增子的长度差异以及DNA模板序列的微小差异造成DNA扩增子的构象差异, 在非变性的琼脂糖凝胶电泳中呈现泳动速率的差异。RAPD实验需要应用多条随机引物, 比较多个凝胶图谱的分子标记多态性的集合相似度和聚类关系。所以, 选择随机引物的种类和数量对RAPD多态性的整体差异比较至关重要^[16]。

冬虫夏草RAPD研究论文报道了筛选20~65条不等的随机引物, 根据扩增子数目和目测丰度, 选择发表了其中8~29条引物(7%~63%)的RAPD结果^[31-32,60-64]。为避免引物选择的偏斜导致研究结果不能如实反映受检样本分子标记多态性的整体, RAPD研究需应用多条随机引物(15~20条或更多), 而仅选用少数几条引物可能导致RAPD研究结果的片面性, 存在学术风险隐患^[5,16]。

我们应用文献[5,35]报道的10条随机引物重复RAPD研究^[38], 发现李增智等^[35]所用的8条随机引物(S7、S10、S31、S69、S80、S23、S33、S61)的RAPD图谱, 以扩增子非加权的Nei-Li公式(亦称Nei系数法)^[65]计算(下文分析该算法的科学性), 子囊果与中国被毛孢样本分子标记多态性呈现低相似度(0.69), 与全部10条引物的RAPD相似度(0.65)相近^[38]。被文献[35]选用、但未被文献[5]选用的5条随机引物(S7、S10、S31、S69、S80)的RAPD图谱, 子囊果与中国被毛孢样本分子标记相似度仅为0.60。而文献[5]所用的5条随机引物(S23、S33、S61、OPV14、OPW06)的RAPD图谱, 分子标记相似度高达0.78(+30%), 提示随机引物选择可能出现偏斜而影响该文的结论^[38], 也证明选择随机引物的种类和数量对RAPD分子标记多态性研究的结果和解释至关重要^[16]。

我们根据文献[5,35,60,63-64]增加随机引物至20条, 重复实验^[33]。与文献[34-35,60-64]报道相似, 20幅RAPD图谱揭示了冬虫夏草不同部位样本的丰裕的整体RAPD分子标记多态性, 也揭示了中国被毛孢与天然冬虫夏草样本的分子标记多态性的相似度极低,



冬虫夏草子囊果部位和中国被毛孢菌丝体提取基因组DNA用于PCR模板。AC表示成熟冬虫夏草的子囊果部位; Hs表示中国被毛孢菌丝体。The genomic DNA used as the template for PCR was isolated from the ascocarp portion of mature *C. sinensis* and from *H. sinensis* mycelia. AC refers to the ascocarp portion of mature *C. sinensis*, and Hs refers to the *H. sinensis* mycelia.

图4 琼脂糖凝胶电泳检验引物S31(左图)和OPB-01(右图) RAPD PCR扩增子(参考文献[33], 经过《北京大学学报(医学版)》许可)

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of the RAPD PCR amplicons with using Primers S31 (left panel) or OPB-01 (right panel) [reference [33], with permission from Journal of Peking University (Health Sciences)]

仅有0.55~0.68, 提示遗传背景的巨大整体差异^[33]。

2.2 多态性整体相似度的算法

分子标记多态性的宏观研究依赖于计算样本间分子标记多态性的整体集合相似度和构建聚类树。以往的RAPD分子标记多态性整体差异研究无一例外地采用PCR扩增子丰度非加权算法Nei-Li公式^[65]计算相似度(S):

$$S = (2N_{AB}) / (N_A + N_B) \quad (1)$$

其中, N_{AB} 为泳道A和B共有条带的数目, N_A 、 N_B 分别为泳道A或泳道B中的全部扩增子数目; $N_A + N_B$ 为两条泳道全部扩增子数目之和。这一算法与丰度非加权Odum算法相同^[25,66]。

该算法用于分子标记和蛋白组学多态性相似度、电泳、色谱或质谱化学指纹谱相似度的宏观、整体分析需要两个计算生物学前提: (1)进入计算的电泳泳道、色谱或质谱中的任何共有DNA条带、蛋白质条带或其他化学成分具有同等或近似的丰度、峰高或峰曲线下面积; (2)所有DNA条带、蛋白质条带或其他化学成分可通过电泳、色谱或质谱等方法

与分子量相似/构象相似、泳动速度或保留时间相似的成分完全分离^[33,38]。这一丰度非加权算法适用于“全或无”的定性分析, 特别是用于分析纯化菌物限制性内切酶水解片段的基因突变研究, 但用于研究多菌共存的冬虫夏草复杂生物体则会出现偏差。图4为两个RAPD多态性整体比较的实例^[33]。应用Nei-Li公式①^[65]计算, 图4左图S31图谱和右图OPB-01图谱子囊果(AC: ascocarp)和中国被毛孢菌丝体Hs样本的相似度分别为0.50和0.29。由于Nei-Li公式①忽略了图中高丰度扩增子在相似度计算中应有的高权重(左图不同泳道的570, 1 700, 1 974 bp条带, 和右图两条泳道共有的973 bp条带), 导致多条低丰度扩增子在计算中获得相对过高的权重, 而降低了高丰度扩增子应有的高权重。

图4提示, 丰度非加权算法不适用于冬虫夏草复杂生物体的研究。基于冬虫夏草PCR扩增子丰度的差异, 我们开发了丰度加权ZUNIX相似度系列公式和应用软件(<http://www.ebioland.com/ZUNIX.htm>; Beijing Bioland Technology, 2013), 用于冬虫夏草样本RAPD分子标记多态性和蛋白组学多态性的相似度比较^[33,38,58]。这一系列公式综合考虑: (1)非共有DNA(或蛋白)条带及其丰度; (2)共有DNA(或蛋白)条带的丰度差异。ZUNIX公式②适用于比较两条泳道样品的RAPD多态性相似度:

$$S = \frac{\sum_{k=1}^m [2 \text{Min}\{d_{1k}, d_{2k}\}]}{\sum_{k=1}^m (d_{1k} + d_{2k})} \quad (2)$$

其中, $d_{ik} \geq 0$, $i=1,2$; $k=1,2, \dots, m$ 。两条泳道的共有DNA条带的丰度(d_{1k} 和 d_{2k})的相似部分只是两者丰度相同的部分: $2\text{Min}\{d_{1k}, d_{2k}\}$; 而不相似的部分为: $(d_{1k} + d_{2k}) - 2\text{Min}\{d_{1k}, d_{2k}\} = \text{Max}\{d_{1k}, d_{2k}\} - \text{Min}\{d_{1k}, d_{2k}\}$ 。

ZUNIX公式③扩展公式②的功能, 用于比较三条泳道样品的RAPD多态性相似度^[33,38]:

$$S = \frac{\sum_{l=1}^m [3 \text{Min}\{d_{1k}, d_{2k}, d_{3k}\}]}{\sum_{l=1}^m (d_{1l} + d_{2l} + d_{3l})} \quad (3)$$

其中, $d_{ik} \geq 0$, $i=1,2,3$; $k=1,2, \dots, m$ 。三条泳道的共有DNA条带的丰度(d_{1k} 、 d_{2k} 和 d_{3k})的相似部分只是三者丰度相同的部分: $3\text{Min}\{d_{1k}, d_{2k}, d_{3k}\}$ 。

ZUNIX公式④进一步扩展公式②③的功能, 用于比较多条泳道样品的RAPD多态性相似度^[33,38,58]:

$$S = \frac{\sum_{k=1}^m [n \text{Min}\{d_{1k}, d_{2k}, \dots, d_{nk}\}]}{\sum_{r=1}^n \sum_{s=1}^m d_{rs}} \quad (4)$$

其中 $d_{ik} \geq 0$, $i=1,2, \dots, n$; $k=1,2, \dots, m$ 。

相异度Dissimilarity(*DS*)(有文献称其为“遗传距离”)计算公式^[38]为:

$$DS=1-S \quad \text{⑤}$$

丰度加权ZUNIX相似度公式具有普遍性(涵盖丰度非加权Nei-Li公式①所适用的特殊各例),用于冬虫夏草RAPD多态性相似度分析,如实反映各个扩增子丰度的权重^[33,38,58]。图4左图两样本RAPD多态性相似度从丰度非加权Nei-Li公式①计算的0.50,降至丰度加权ZUNIX公式②计算的0.23(-54%);而右图相似度从Nei-Li公式①计算的0.29升至ZUNIX公式②计算的0.83(+189%)^[33]。结果证明,由于冬虫夏草中多菌共存,其样本的RAPD分子标记多态性不能满足丰度非加权算法的两个计算生物学前提,导致RAPD多态性的相似度计算结果出现误差,可能导致错误的结论。而具有计算生物学普遍性的丰度加权ZUNIX相似度系列公式可如实计算冬虫夏草样本的RAPD分子标记和全蛋白组多态性的相似度^[33,38,58]。

2.3 丰度加权聚类法

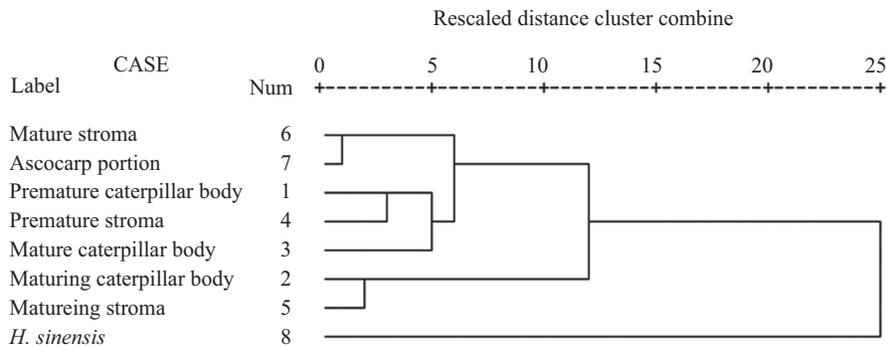
以往的冬虫夏草RAPD研究的聚类分析大多应用PAUP4.0B(Swofford, 2002)、PHYLIP3.5(Sneath and Sokal, 1973)或NTSYS-pc Numerical Taxonomy System软件应用UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)丰度非加权聚类法构建聚类树图^[5,34,60]。与前述相似度计算一样,宏观聚

类分析中应用丰度非加权算法构建聚类树图忽略了高丰度和低丰度扩增子应有的权重差异,会导致构建聚类图时出现偏差。为了便于比较,Ni等^[38]应用同一个软件PAU4.0B(Swofford, 2002)提供的丰度非加权和加权聚类法,应用同一个算法(Neighbor-Joining distance method, 邻接距离法),对同一组数据进行聚类分析,比较丰度非加权和加权两种算法。丰度非加权和加权算法的两个聚类树图的差别仅仅源于是否考虑RAPD扩增子的丰度在计算中的权重,丰度加权聚类法纠正了丰度非加权法构建聚类树图的偏差^[38]。从聚类关系上看,尽管中国被毛孢(分离自四川产的冬虫夏草样本)与成熟中冬虫夏草子座(样本于5月初采自四川康定地区)归入一个分枝,但自展值(Bootstrap值)仅有53%;与该分枝最近距离的子囊果分枝(样本于6月初采自四川康定地区),自展值更低(40%)^[38]。Bootstrap(自助法)是一种基于实验数据的模拟统计学算法,用于评估一组数据的概率分布的特征,提供数值变量的可信度,即自展值。在聚类分析构建进化树图时经过预设的重复次数(至少1 000次)的重新排列数据位点顺序、构建聚类树。自展值100%为每次随机的数据重新排列后,该分枝均出现。而自展值越小说明分枝的可信度越低。

虽然应用PAUP4.0B软件丰度加权聚类法构建聚类树准确性高,但该软件的丰度加权聚类法只是半定量方法,需要进行数据半定量赋值^[33,38,58]。Ni

***** HIERARCHICAL CLUSTER ANALYSIS *****

Dendrogram using Complete Linkage



应用SPSS 10.1软件提供的丰度加权聚类法(Complete Linkage method of hierarchical cluster analysis)分析文献^[38]的全部10幅RAPD图谱PCR扩增子信息。

The cluster tree for the PCR amplicons of all 10 primer RAPD gels^[38] was constructed using the fully quantitative density-weighted, parametric algorithm provided by SPSS 10.1 software (Complete Linkage method of hierarchical cluster analysis).

图5 RAPD图谱PCR扩增子全定量、集合丰度加权算法聚类树图

Fig.5 Integral cluster tree constructed using the fully quantitative density-weighted algorithm

等^[38]进一步应用了其他聚类软件进行全定量丰度加权聚类分析: Cluster 3.0(Stanford University, CA and Human Genome Center, University of Tokyo)、JMP9(The SAS Institute, Cary, NC)和SPSS 10.1(SPSS Inc., Chicago, IL)^[38]。图5显示全定量丰度加权聚类法聚类树图(以SPSS软件提供的 Complete Linkage 算法为代表),呈现4个冬虫夏草聚类分叶(注:样本采自四川康定地区;未成熟和成熟中冬虫夏草采于5月中旬;成熟冬虫夏草采于6月中旬):分叶(1)成熟子座和子囊果(mature stroma #6和 ascocar portion #7)、分叶(2)未成熟僵虫体和子座(premature caterpillar #1和 stroma #4)、分叶(3)成熟僵虫体(mature caterpillar #3)和分叶(4)成熟中僵虫体和子座(maturing caterpillar #2和 stroma #5)。分叶(2)和(3)形成小分枝,与分叶(1)聚为聚类小群。分叶(4)以稍远的距离(rescaled distance)汇入聚类小群,形成一个聚类大群。图5也显示中国被毛孢分枝以极远的距离与冬虫夏草聚类大群远隔。

上述聚类法的比较证明应用丰度非加权UPGMA聚类法无法全面捕捉样本RAPD扩增子的全部分子信息,所构建的聚类树无法如实地反映样本间量化聚类关系,影响研究的结论,不适用于多菌共存的冬虫夏草研究。而丰度加权聚类法用于冬虫夏草的研究具有优势,能全面地捕捉全部RAPD分子信息,所构建聚类树图可如实反映样本间的量化聚类关系,适用于冬虫夏草研究。全定量丰度加权聚类法的软件操作简便,量化准确,但所有软件均不提供自展值的计算程序。而半定量丰度加权聚类法的PAUP软件提供自展值计算程序,提示各个聚类分枝、分叶的可信度;但在半定量分级赋值时轻度降低了量化计算的敏感度。全定量和半定量两种丰度加权聚类法各有优势,均可用于冬虫夏草分子系统学的宏观整体研究。

3 冬虫夏草真菌分子系统学的结语与展望

分子系统学的微观和宏观研究构成多菌共生共存的冬虫夏草*C. sinensis*分子系统学研究的整体。但以往的研究对冬虫夏草的整体认识、实验设计和方法以及实验结果的分析方法等诸多方面存在局限,例如:微观研究中ITS扩增子的多元异质性,扩增子多元异质性对真菌条形码构成的影响,多种真菌ITS扩增子是否来源于同一种真菌的基因组,量化分

析各个冬虫夏草内生菌物在冬虫夏草成熟过程中非同步的动态变化,天然冬虫夏草全基因组测序、转录组测序和蛋白组学研究的联合应用,冬虫夏草菌*O. sinensis*是否是单一真菌的拉丁名,冬虫夏草物种复合体(中国药典)中多菌共存以及它们之间的协同共生关系以及宏观研究中RAPD随机引物的选择和计算生物学方法的选择等。这些学术课题应适时引起学界的关注,以避免对天然冬虫夏草的科学认识的偏差^[67]。

刘锡琏等^[8]创建的中国被毛孢是冬虫夏草菌的无性型的学说广受重视^[5-6,12]。然而因为严格按照柯赫氏法则Koch's Postulates进行冬虫夏草有性子实体和子囊孢子人工诱发实验不成功,这一学说至今还缺少直接证据^[6,9,12-18]。如本文所述,因为实验设计、研究方法和结果分析方法等原因,支持这一学说的分子系统学微观和宏观研究的证据还有商榷之处。图3所示Southern杂交试验(不经PCR指数性扩增)证明,中国被毛孢在冬虫夏草子座中只是劣势存在。如要证明劣势存在的中国被毛孢是冬虫夏草菌的真正无性型,而优势存在的AT偏倚基因型冬虫夏草菌不是,惟有通过严格按照柯赫氏法则完成冬虫夏草有性子实体和子囊孢子人工诱发实验才能得出正确结论^[14,16]。为此,探索AT偏倚基因型冬虫夏草菌的培养条件、建立培养方法成为必要^[52],也成为这一学术课题的技术瓶颈。因为冬虫夏草菌*O. sinensis*是一种真菌^[5-6]还是一组真菌的总称^[10,20-24,27-29,32,52]、抑或是多种真菌的总称^[9,14,16,21,23-26,39,49-51]的学术争议,导致“One Fungus=One Name”^[68-69]在冬虫夏草研究中的应用为时尚早,尚需证明冬虫夏草菌确为“One Fungus”。近年的冬虫夏草分子生物学研究不断有新证据证实天然冬虫夏草*C. sinensis*是多种真菌、多种突变基因型冬虫夏草菌与蝙蝠蛾幼虫尸体的物种复合体,是“一个统一微生态系统”^[15-16,25-26]。分子生物学研究证实,蝙蝠蛾拟青霉和多种突变基因型冬虫夏草菌的菌种复合体天然存在于蝙蝠蛾幼虫活体肠道,也天然存在于冬虫夏草的子囊果和子囊孢子^[32,39]。与纯化的中国被毛孢比较,这一菌种复合体中的菌物协同共生,对蝙蝠蛾幼虫的感染活性增强39倍之多^[39]。我们期盼更多的天然冬虫夏草多菌协同共生的研究证据,彻底揭开天然冬虫夏草“统一微生态系统”中多菌种共生之谜,从理论上突破大规模冬虫夏草人工培植的技术难题^[67]。

致谢——感谢戴如琴教授、臧穆教授、郭英兰教授、宋燕教授、李玉玲教授、刘欣教授、朱平教授、王成树教授、刘杏忠教授、张永杰教授、姚一建教授、周妍娇博士、赵佳钢博士、夏予博士、姚艺桑、高凌、董运梓、张丽娟、吴子嫩、马少丽、许海峰、郑陶冶、谌巍、谈宁芝、杨明、周玉春、李进进等的帮助。

参考文献 (References)

- Zhu JS, Halpern GM, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: Part I. *J Altern Complement Med* 1998; 4(3): 289-303.
- Zhu JS, Halpern GM, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: Part II. *J Altern Complement Med* 1998; 4(4): 429-57.
- 李长龄, 谈宁芝, Barger JL, 张燕, Ferguson SB, Prolla TA, 等. 全基因表达芯片技术结合小鼠寿命研究用于中药抗衰老产品的研究. 杭州: 中药新产品创新与产业化发展战略研讨高峰论坛论文集. 中国中药杂志社和浙江大学出版社 (Li Changling, Tan Ningzhi, Barger JL, Zhang Yan, Ferguson SB, Prolla TA, *et al.* Combined use of whole-gene expression profiling technology and mouse lifespan test in anti-aging herbal product study. Proceeding of New TCM Products Innovation and Industrial Development Summit. China Journal Chinese Materia Medica and Zhejiang University Publishing, Hangzhou) 2011, 443-8.
- 宋立人, 洪恂, 丁绪亮, 臧载阳. 现代中药学大辞典. 北京: 人民卫生出版社 (Song Liren, Hong Xun, Ding Xuling, Zang Zaiyang. Monographs of Modern Pharmacy of Chinese Traditional Medicine. Beijing: People's Health Publishing House) 2001, 733-7.
- 魏鑫丽, 印象初, 郭英兰, 沈南英, 魏江春. 冬虫夏草及其相关类群的分子系统学分析. 菌物学报 (Wei Xinli, Yin Xiangchu, Guo Yinglan, Shen Nanying, Wei Jiangchun. Analyses of molecular systematics on *Cordyceps sinensis* and its related taxa. *Mycosystema*) 2006; 25(2): 192-202.
- 郭英兰, 肖培根, 魏江春. 论冬虫夏草生物学与可持续利用. 中国现代中药 (Guo Yinglan, Xiao Peigeng, Wei Jiangchun. On the biology and sustainable utilization of the Chinese medicine treasure *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G. H. Sung *et al.* *Modern Chin Med*) 2010; 12(11): 3-8.
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* 2007; 57(1): 5-59.
- 刘锡璠, 郭英兰, 俞永信, 曾纬. 冬虫夏草无性阶段的分离和鉴定. 真菌学报 (Liu Xihan, Guo Yinglan, Yu Yongxin, Zeng Wei. Isolation and identification of the anamorph of *Cordyceps sinensis* fungus. *Acta Mycologica Sinica*) 1989; 8(1): 35-40.
- Barseghyan GS, Holliday JC, Price TC, Madison LM, Wasser SP. Growth and cultural-morphological characteristics of vegetative mycelia of medicinal caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* G.H. Sung *et al.* (Ascomycetes) Isolates from Tibetan Plateau (P.R.China). *Intl J Med Mushrooms* 2011; 13(6): 565-81.
- Zhu JS, Gao L, Li XH, Yao YS, Zhou YJ, Zhao JQ, *et al.* Maturation alterations of oppositely orientated rDNA and differential proliferations of CG:AT-biased genotypes of *Cordyceps sinensis* fungi and *Paecilomyces hepiali* in natural *Cordyceps sinensis*. *Am J Biomed Sci* 2010; 2(3): 217-38.
- Chen YQ, Hu B, Xu F, Zhang WM. Genetic variation of *Cordyceps sinensis*, a fruit-body-producing entomopathogenic species from different geographical regions in China. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 230: 153-8.
- 肖岩岩, 陈超, 董建飞, 李春如, 樊美珍. 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. 安徽农业大学学报 (Xiao Yanyan, Chen Chao, Dong Jianfei, Li Chunru, Fan Meizhen. Morphological observation of ascospores of *Ophiocordyceps sinensis* and its anamorph in growth process. *Journal of Anhui Agricultural University*) 2011; 38(4): 587-91.
- Hu X, Zhang YJ, Xiao GH, Zheng P, Xia YL, Zhang WY, *et al.* Genome survey uncovers the secrets of sex and lifestyle in caterpillar fungus. *Chin Sci Bull* 2013; 58: 2846-54.
- 梁宗琦. 虫草的无性型及其鉴定. 西南农学报 (Liang Zongqi. Anamorphs of cordyceps and their determination. *Southwest Chin J Agricult Sci*) 1991; 4(4): 1-8.
- 梁宗琦, 韩燕峰, 梁建东, 董旋, 杜文. 冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 研究中几个值得关注的问题. 微生物学通报 (Liang Zongqi, Han Yanfeng, Liang Jiandong, Dong Xuan, Du Wen. Issues of concern in the studies of *Ophiocordyceps sinensis*. *Microbiol Chin*) 2010; 37(11): 1692-7.
- 蒋毅, 姚一建. 冬虫夏草无性型研究概况. 菌物系统 (Jiang Yi, Yao Yijian. A review for the debating studies on the anamorph of *Cordyceps sinensis*. *Mycosystema*) 2003; 22(1): 161-76.
- 杨静雅. 几种鉴定冬虫夏草无性型的方法. 青海师范大学学报 (自然科学版) (Yang Jingya. Identifying methods of *Cordyceps conidial forms*. *J Qinghai Normal Univ Nat Sci*) 2005; 1: 77-80.
- 张平. 虫草属真菌研究进展. 生物学杂志 (Zhang Ping. Advances on cordyceps genus fungi research. *J Biol*) 2003; 20(6): 43-5.
- 靳朝霞, 杨少辉. 冬虫夏草的研究进展与发展趋势. 天津医科大学学报 (Jin Zhaoxia, Yang Shaohui. Progresses and trends of *Cordyceps sinensis* studies. *J Tianjin Med Univ*) 2005; 11(1): 137-40.
- Stensrud Ø, Schumacher T, Shalchian-Tabrizi K, Svegardenib IB, Kausrud H. Accelerated nrDNA evolution and profound AT bias in the medicinal fungus *Cordyceps sinensis*. *Mycol Res* 2007; 111: 409-15.
- 朱佳石, 郭英兰, 姚艺桑, 周妍娇, 陆继红, 齐莹, 等. 冬虫夏草成熟过程中中国被毛孢和蝙蝠蛾拟青霉 DNA 共存和竞争增殖力及化学成分指纹谱的变化. 菌物研究 (Zhu Jiashi, Guo Yinglan, Yao Yisang, Zhou Yanjiao, Lu Jihong, Qi Ying, *et al.* Maturation of *Cordyceps sinensis* associates with co-existence of *Hirsutella sinensis* and *Paecilomyces hepiali* DNA and dynamic changes in fungal competitive proliferation predominance and chemical profiles. *J Fungal Res*) 2007; 5(4): 214-24.
- 朱佳石, 赵家刚, 高凌, 李晓红, 赵建晴, 陆继红. 至少六个突变基因型冬虫夏草菌在冬虫夏草子座中表达的动态变化. 菌物研究 (Zhu Jiashi, Zhao Jiagang, Gao Ling, Li Xiaohong, Zhao Jianqing, Lu Jihong. Dynamically altered expressions of at least 6 *Ophiocordyceps sinensis* mutants in the stroma of *Cordyceps sinensis*. *J Fungal Res*) 2012; 10(2): 100-12.
- 杨金玲, 肖薇, 何惠霞, 朱慧新, 王淑芳, 程克棣, 等. 蝙蝠蛾拟青霉与冬虫夏草关系的分子系统学研究. 药学报 (Yang Jinling, Xiao Wei, He Huixia, Zhu Huixin, Wang Shufang, Cheng Kedi, *et al.* Molecular phylogenetic analysis of *Paecilomyces*

- hepiali* and *Cordyceps sinensis*. *Acta Pharmaceutica Sinica* 2008; 43(4): 421-6.
- 24 Xiao W, Yang JP, Zhu P, Cheng KD, He HX, Zhu HX, *et al.* Non-support of species complex hypothesis of *Cordyceps sinensis* by targeted rDNA-ITS sequence analysis. *Mycosystema* 2009; 28(6): 724-30.
- 25 张永杰, 孙炳达, 张 姝, 旺 姆, 刘杏忠, 巩文峰. 分离自冬虫夏草可培养真菌的多样性研究. *菌物学报* (Zhang Yongjie, Sun Bingda, Zhang Shu, Wangmu, Liu Xingzhong, Gong Wenfeng. *Mycobiotical investigation of natural *Ophiocordyceps sinensis* based on culture-dependent investigation. *Mycosystema* 2010; 29(4): 518-27.*
- 26 Zhang YJ, Zhang S, Wang M, Bai FY, Liu XZ. High diversity of the Fungal community structure in naturally-occurring *Ophiocordyceps sinensis*. *PLoS One* 2010; 5(12): e15570.
- 27 高 凌, 李晓红, 赵建晴, 陆继红, 朱佳石. MassARRAY单核苷酸多态性(SNP) MALDI-TOF质谱基因分型法检测未成熟冬虫夏草子座中多个冬虫夏草菌突变基因型. *北京大学学报(医学科学版)* [Gao Ling, Li Xiaohong, Zhao Jianqing, Lu Jihong, Zhu Jiashi. Detection of multiple *Ophiocordyceps sinensis* mutants in premature stroma of *Cordyceps sinensis* by MassARRAY SNP MALDI-TOF mass spectrum genotyping. *Journal of Peking University (Health Sciences)* 2011; 43(2): 259-266.
- 28 高 凌, 李晓红, 赵建晴, 陆继红, 赵家刚, 朱佳石. 冬虫夏草的成熟伴随着冬虫夏草子座中多个基因突变型冬虫夏草菌表达的改变. *北京大学学报(医学科学版)* [Gao Ling, Li Xiaohong, Zhao Jianqing, Lu Jihong, Zhu Jiashi. Maturation of *Cordyceps sinensis* associates with alterations of fungal expressions of multiple *Ophiocordyceps sinensis* mutants with transition and transversion point mutations in stroma of *Cordyceps sinensis*. *Journal of Peking University (Health Sciences)* 2012; 44(3): 454-63.
- 29 姚艺桑, 周妍娇, 高 凌, 陆继红, 吴子嫩, 朱佳石. 冬虫夏草菌及其突变基因型在冬虫夏草成熟过程中差异表达的动态变化. *菌物研究* (Yao Yisang, Zhou Yanjiao, Gao Ling, Lu Jihong, Wu Zimei, Zhu Jiashi. Dynamic alterations of the differential fungal expressions of *Ophiocordyceps sinensis* and its mutant genotypes in stroma and caterpillar during maturation of natural *Cordyceps sinensis*. *J Fungal Res* 2011; 9(1): 37-49, 53.
- 30 徐锦堂. *中国药用真菌学*. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社 (Xu Jintang. *Chinese Medicinal Mycology*. Beijing: Beijing Medical University and China Union Medical University Join Publishing House) 1997, 68-107.
- 31 Shim WB, Sagaram US, Choi YE, So J, Wilkinson HH, Lee YW. FSR1 is essential for virulence and female fertility in *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 2006; 19(7): 725-33.
- 32 Zhu JS, Yao YS, Gao L, Wu, ZM, Li YL, Zhao JG. Dynamically altered fungal expressions of *Paecilomyces hepiali* and 7 *Ophiocordyceps sinensis* genotypes in natural *Cordyceps sinensis*. The 10th Intl Mycol Congress, Bangkok, Thailand, 2014. Special Symposium 5.
- 33 姚艺桑, 高 凌, 李玉玲, 马少丽, 吴子嫩, 谈宁芝, 等. 丰度加权法分析冬虫夏草RAPD多态性高度差异及动态变化. *北京大学学报(医学科学版)* [Yao Yisang, Gao Ling, Li Yuling, Ma Shaoli, Wu Zimei, Tan Ningzhi, *et al.* Amplicon density-weighted algorithms analyze dissimilarity and dynamic alterations of RAPD polymorphisms in the integrated micro-Ecosystem *Cordyceps sinensis*. *Journal of Peking University (Health Sciences)* 2014; 46(4): 618-28.
- 34 Chen YJ, Zhang YP, Yang YX, Yang DR. Genetic diversity and taxonomic implication of *Cordyceps sinensis* as revealed by RAPD markers. *Biochem Genet* 1999; 37: 201-13.
- 35 李增智, 黄 勃, 李春如, 樊美珍. 确证冬虫夏草无性型的分子生物学证据. *菌物系统* (Li Zengzhi, Huang Bo, Li Chunru, Fan Meizhen. Molecular evidence for anamorph determination of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. *Mycosystema* 2000; 19(1): 60-4.
- 36 宋敦伦, 张 军, 陈建新. DNA分子标记及其在冬虫夏草研究中的应用. *食用菌学报* (Song Dunlun, Zhang Jun, Chen Jianxin. DNA molecular markers and their application in *Cordyceps sinensis* research. *Acta Edulis Fungi* 2002; 9(3): 52-5.
- 37 白 玉. DNA分子标记技术及其应用. *安徽农业科学* (Bai Yu. DNA molecular marker techniques and their application. *J Anhui Agri Sci* 2007; 35(24): 7422-4.
- 38 Ni LQ, Yao YS, Gao L, Wu ZM, Tan NZ, Zhu JS. Arithmetic methods for similarity computation and cluster tree construction in RAPD analysis on a multi-fungi microecology system, *Cordyceps sinensis*. *Am J BioMed Sci* 2014; 6(2): 82-104.
- 39 Li YL, Yao YS, Ma SL, Xu HF, Liu X, Wu ZM, *et al.* Inoculation potency enhancement using fungal complexes isolated from the intestine of living *Hepialus armoricanus* larvae. The 10th Intl Mycol Congress, Bangkok, Thailand, 2014, 3-8.
- 40 Hseu RS, Chen CS. Gene sequence and method for distinguishing *Cordyceps sinensis*. United States Patent 6,251,606. 2001.
- 41 陈志升, 许瑞祥. 利用18S rRNA基因序列鉴别冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.之研究. *台湾农业化学与食品科学* (Chen CS, Hseu RS. Differentiation of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. with 18S rRNA gene sequences. *Taiwanese J Agri Chem Food Sci* 2002; 40(4): 219-25.
- 42 赵 锦, 王 宁, 陈月琴, 李泰辉, 屈良鹄. 冬虫夏草无性型的分子鉴别. *中山大学学报* (Zhao Jin, Wang Ning, Chen Yueqin, Li Taihei, Qu Linghu. Molecular identification for the asexual stage of *Cordyceps sinensis*. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*) 1999; 38(1): 122-3.
- 43 王 宁, 陈月琴, 章卫民, 李泰辉, 屈良鹄. 虫草属多元起源的分子生物学证据. *中山大学学报* (Wang Ning, Chen Yueqin, Zhang Weimin, Li Taihui, Qu Lianghu. Molecular evidences indicating multiple origins in the entomogenous *Cordyceps*. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*) 2000; 39(4): 70-3.
- 44 Kinjo N, Zang M. Morphological and phylogenetic studies on *Cordyceps sinensis* distributed in southwestern China. *Mycoscience* 2001; 42: 567-74.
- 45 Liu ZY, Yao YJ, Liang ZQ, Liu AY, Pegler DN, Chase MW. Molecular evidence for the anamorph-teleomorph connection in *Cordyceps sinensis*. *Mycol Res* 2001; 105(7): 827-32.
- 46 Chen YQ, Wang N, Qu LH, Li TH, Zhang WM. Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA. *Biochem Systemat Ecol* 2001; 29: 597-607.
- 47 Chen YQ, Wang N, Zhou H, Qu LH. Differentiation of medicinal *Cordyceps* species by rDNA ITS sequence analysis. *Planta Med* 2002; 68: 635-9.
- 48 郝剑谨, 程 舟, 梁洪卉, 杨晓伶, 李 珊, 周铜水, 等. 基于rDNA

- ITS序列探讨我国冬虫夏草的遗传分化及分布格局. 中草药(Hao Jianjin, Cheng Zhou, Liang Honghui, Yang Xiaoling, Li Shan, Zhou Tongshui, *et al.* Genetic differentiation and distributing pattern of *Cordyceps sinensis* in China revealed by rDNA ITS sequences. Chin Tradit Herbal Drugs) 2009; 40(1): 112-6.
- 49 Chen J, Zhang W, Lu T, Li J, Zheng Y, Kong LD. Morphological and genetic characterization of a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus and its polysaccharide component possessing antioxidant property in H22 tumor-bearing mice. Life Sci 2006; 78(23): 2742-8.
- 50 Leung PH, Zhang QX, Wu JY. Mycelium cultivation, chemical composition and antitumour activity of a *Tolypocladium* sp. fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*. J Appl Microbiol 2006; 101(2): 275-83.
- 51 Jiang Y, Yao YJ. ITS sequence analysis and ascoma development of *Pseudogymnoascus roseus*. Mycotaxon 2005; 94: 55-73.
- 52 Zhang S, Zhang YJ, Liu XZ, Zhang H, Liu DS. On the reliability of DNA sequences of *Ophiocordyceps sinensis* in public data bases. J Ind Microbiol Biotechnol 2013; 40: 365-78.
- 53 毛雄民, 赵世明, 曹莉, 颜珣, 韩日畴. 不同产地冬虫夏草无性型的形态观察. 环境昆虫学报(Mao Xiongmin, Zhao Shimin, Cao Li, Yan Xun, Han Rixun. The morphology observation of *Ophiocordyceps sinensis* from different origins. J Environmental Entomol) 2013; 35(3): 343-53.
- 54 张磊, 肖岩岩, 陈超, 李春如. 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. 安徽农业大学学报(Zhang Lei, Xiao Yanyan, Chen Chao, Li Chunru. Preliminary analysis of MAT1-2-1 mating type genes of anamorphic isolates from different sources of *Ophiocordyceps sinensis*. J Anhui Agricult Univ) 2013; 40(5): 819-22.
- 55 Bushley KE, Li Y, Wang WJ, Wang XL, Jiao L, Spatafora JW, *et al.* Isolation of the MAT1-1 mating type idiomorph and evidence for selfing in the Chinese medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis*. Fungal Biol 2013; 117(9): 599-610.
- 56 王成树. 昆虫真菌比较基因组研究. 第十届海峡两岸菌物学学术研讨会论文集. 2011年7月. 中国武汉(Wang Chengshu. Comparative genomics of insect-infection fungi. Proceedings 10th Symposium Mycol Societies cross Taiwan Strait. July 2011. Wuhan, China) <http://cpfd.cnki.com.cn/Article/CPFDTOTAL-ZGVL201107001007.htm>
- 57 Xiang L, Li Y, Zhu YJ, Luo HM, Li CF, Xu XL, *et al.* Transcriptome analysis of the *Ophiocordyceps sinensis* fruiting body reveals putative genes involved in fruiting body development and cordycepin biosynthesis. Genomics 2014; 103: 154-9.
- 58 Dong YZ, Zhang LJ, Wu ZM, Gao L, Yao YS, Tan NZ, *et al.* Altered proteomic polymorphism in the caterpillar body and stroma of natural *Cordyceps sinensis* during maturation. PLoS One 2014; 9(10): e109083.
- 59 Li Yi, Jiao L, Yao YJ. Non-concerted ITS evolution in fungi, as revealed from the important medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis*. Mol Phylogenet Evol 2013; 68: 373-9.
- 60 张云武, 陈永久, 沈发荣, 杨跃雄, 杨大荣, 张亚平. 滇西北地区冬虫夏草和阔孢虫草的遗传分化研究. 菌物系统(Zhang Yunwu, Chen Yongjiu, Shen Farong, Yang Yuexiong, Yang Darong, Zhang Yaping. Study of genetic divergence in *Cordyceps sinensis* and *C. crassispora* from Northwest of Yunnan by using RAPD. Mycosystema) 1999; 18(2): 176-83.
- 61 于超, 何俊琳, 曾纬, 邓斌. 康定冬虫夏草与人工虫草的RAPD指纹图谱比较研究. 中草药(Yu Chao, He Junlin, Zeng Wei, Deng Bin. Fingerprint comparison on *Cordyceps sinensis* and artificial ones by RAPD. Chin Tradit Herbal Drugs) 2005; 36(2): 274-7.
- 62 Feng K, Wang S, Hu DJ, Yang FQ, Wang HX, Li SP. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and the nucleosides assessment of fungal strains isolated from natural *Cordyceps sinensis*. J Pharmaceut Biomed Anal 2009; 50: 522-6.
- 63 钱敏, 曾纬, 张德利. 冬虫夏草RAPD多态性分析. 时珍国医国药(Qian Min, Zeng Wei, Zhang Deli. RAPD polymorphism analysis on *Cordyceps sinensis*. LisShenzhen Med Materia Medica Res) 2011; 22(7): 1738-9.
- 64 谢放, 朱子雄, 陈京津. 甘肃省冬虫夏草菌的RAPD和ITS序列分析. 中国微生态学杂志(Xie Fang, Zhu Zixiong, Chen Jingjin. RAPD and analysis of ITS sequences of *Ophiocordyceps sinensis* in Gansu. Chin J Micro Ecol) 2011; 23(3): 219-22, 229.
- 65 Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 74(10): 5269-73.
- 66 Odum EP. Principles and concepts pertaining to organization at the community level. In: Odum EP (ed.) Fundamentals of ecology. W.B. Saunders, Philadelphia, PA, 1971, 140-61.
- 67 Ioannidis JPA. How to make more published research true. PLoS Med 2014; 11(10): e1001747.
- 68 Taylor JW. One Fungus=One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. IMA Fungus 2011; 2(2): 113-20.
- 69 张姝, 张永杰, Shrestha B, 徐建平, 王成树, 刘杏忠. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望. 菌物学报(Zhang Shu, Zhang Yongjie, Shrestha B, Xu Jianping, Wang Chengshu, Liu Xingzhong. *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*: Research advances, issues and perspectives. Mycosystema) 2013; 32(4): 577-97.