

冬虫夏草和中国被毛孢形态学再研究

何苏琴^{1*} 王三喜² 罗进仓¹ 李风庆² 金秀琳¹ 文朝慧³ 马福全² 周昭旭¹ 唐德志¹

(1. 甘肃省农业科学院植物保护研究所 甘肃 兰州 730070)

(2. 甘肃省甘南州农业科学研究所 甘肃 合作 747000)

(3. 甘肃省出入境检验检疫局 甘肃 兰州 730070)

摘要: 产自甘肃省冬虫夏草主产区的冬虫夏草具有丰富的形态多样性, 少数具有 2-4 个子座, 个别子座叉状分枝。通过移栽培养, 对冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 子座的发育过程进行了连续观察, 并对子囊孢子的萌发及中国被毛孢 *Hirsutella sinensis* 的形态特征进行了再研究。观察到: 在子囊孢子弹射期, 子座可孕部产生明显的缩胀变化; 中国被毛孢在培养条件下产生无色和近黑色两种颜色的分生孢子。

关键词: 虫草, 发育, 形态观察, 培养

The re-study for morphology of *Ophiocordyceps sinensis* and *Hirsutella sinensis*

HE Su-Qin^{1*} WANG San-Xi² LUO Jin-Cang¹ LI Feng-Qing² JIN Xiu-Lin¹
WEN Zhao-Hui³ MA Fu-Quan² ZHOU Zhao-Xu¹ TANG De-Zhi¹

(1. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

(2. Institute of Agricultural Sciences of Gannan Area, Hezuo, Gansu 747000, China)

(3. Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: The stroma of *Ophiocordyceps sinensis* showed a morphological diversity in major occurring areas of *Ophiocordyceps sinensis* in Gansu Province, a few samples have 2-4 stromata per endosclerotium or form dichotomous stroma. The morpha of developping stroma of *Ophiocordyceps sinensis* was systematically researched by transplanting culture. The ascospores germination of *O. sinensis* and the morpha of *Hirsutella sinensis* were observed. The results show that the fertility part of stroma obviously produces the alternation of contraction and expansion during the stage of ascospore ejection, and the culture of *Hirsutella sinensis* has two kinds of different color conidia, colorless or near black ones.

Keywords: *Ophiocordyceps*, Development, Morphologic observation, Culture

冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung *et al.*^[1]作为一种名贵的中药材, 以全草入药,

现代医学认为其主要功效为保肺肾、补精髓、化痰止咳, 多用于肺肾两虚症, 中医多用来治疗肺结核,

基金项目: 甘肃省科技厅科学事业费项目(No. QS051-C31-08)

* 通讯作者: Tel: 86-931-7617133; 信箱: gshesuqin@sina.com

收稿日期: 2011-08-10; 接受日期: 2011-09-23

老人畏冷、咳嗽、衰弱, 产妇及老人贫血, 遗精, 阳痿, 自汗盗汗, 腰膝酸痛, 神经衰弱, 病后久虚, 咯血吐血, 慢性肾炎等^[2]。冬虫夏草在我国有着悠久的药用历史, 有关文献记载可追溯到一千年之前^[3]。

冬虫夏草历来都是中国所产, 属国家二级保护药用植物, 近年才在喜马拉雅山南部的不丹、尼泊尔、印度被采到^[4-5]。

从自然地理上来说, 冬虫夏草的产地大体上北起祁连山, 南至滇西北高山, 东到川西高原山地, 西达喜马拉雅山的大部分地区, 主要分布于青藏高原的西藏、青海、四川、云南、甘肃等省(区)及边缘地区(尼泊尔、不丹、印度等)的高寒草甸之中^[6-7]。

宽阔的地域和生态环境的不同使得冬虫夏草的形态具有较大的个体差异, 进而派生出阔孢虫草(*Cordyceps crassispora* M.Zang *et al.*)、甘肃虫草(*Cordyceps gansuensis* K.Y.Zhang *et al.*)、康定虫草(*Cordyceps kangdingensis* M.Zang & Kinjo)、多轴虫草(*Cordyceps multiaxialis* M.Zang & Kinjo)、尼泊尔虫草(*Cordyceps nepalensis* M.Zang & Kinjo)等多个冬虫夏草近似种^[8-10]。除康定虫草与冬虫夏草的关系尚不明晰外, 其余已被证明均为冬虫夏草的同物异名^[11-14]。

甘肃地处我国黄土高原、蒙古高原、青藏高原和西秦岭山地的交汇过度地带, 青藏高原北缘及祁连山东端是甘肃冬虫夏草的主要分布区, 冬虫夏草的年贮藏量 8.1 t, 甘南藏族自治州的冬虫夏草产量占甘肃省的 90%以上^[15]。

通过对甘肃省所产冬虫夏草的子座形态及其无性型中国被毛孢 *Hirsutella sinensis* X.J. Liu *et al.* 的形态学研究, 以及对子座发育过程的连续观察, 再次印证了冬虫夏草和中国被毛孢具有丰富的形态多样性; 并观察到在子囊孢子弹射期, 冬虫夏草子座可孕部产生明显的缩胀变化, 中国被毛孢在培养条件下产生无色和近黑色两种颜色的分生孢子。

1 材料与方法

1.1 *Ophiocordyceps sinensis* 标样采集及子座形态观察

于 5-6 月, 自甘肃省冬虫夏草主产区的甘南藏族自治州和天祝藏族自治县采集冬虫夏草标样, 观

察并描述子座形态。

1.2 培养基(g/L)

SPPDA: 马铃薯 200, 风干高山草甸土 20, 蛋白胨 2, 葡萄糖 20, 琼脂 12, 自来水 1 000 mL;

PSA: 马铃薯 200, 蔗糖 20, 琼脂 12, 自来水 1 000 mL;

PDA: 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 12, 自来水 1 000 mL;

PD: 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 自来水 1 000 mL。

1.3 *Ophiocordyceps sinensis* 子囊孢子萌发特点观察

收集自然弹射的子囊孢子, 用无菌水稀释后, 分别滴于载玻片及涂布于 PSA 平板上, 15 °C-20 °C 及黑暗条件下培养, 每天镜检, 记载孢子萌发情况并拍照。

1.4 *Ophiocordyceps sinensis* 子座发育过程观察

将自然发育的冬虫夏草幼嫩子座及 4 cm-5 cm 半径内的植物一同小心挖出(不得损伤子座及内菌核), 移栽于直径 20 cm 陶土花盆中, 每盆栽植 3-5 株, 置实验室窗台上, 保持土壤湿润, 每天观察并拍照。本试验在甘肃省农业科学院植物保护研究所的虫草实验室(兰州, 海拔 1 550 m; 试验期间室温 18 °C-28 °C)和甘肃省甘南州农业科学研究所的虫草实验室(合作, 海拔 2 936 m; 试验期间室温 17 °C-24 °C)同时进行。

1.5 *Ophiocordyceps sinensis* 标样的组织分离

以每株虫草为单位, 采用常规组织分离法对子座和内菌核分别进行分离培养。去除标样表面土粒及杂物, 将分离组织剪成长 5 mm 节段, 75% 乙醇表面消毒后, 灭菌水冲洗 4-5 次, 用灭菌滤纸吸干表面水分后, 放于 SPPDA 平板上, 20 °C 培养, 每日检查, 长出真菌及时转出纯化。60 d 后统计分离率。

分离率(%)=(分离到该菌的标样数/标样总数)×100。

1.6 *Hirsutella sinensis* 形态观察和分子生物学鉴定

1.6.1 形态观察: 对分离自甘肃甘南冬虫夏草标样的 8 个中国被毛孢菌株(Cordy-001-Cordy-008)进行了形态观察。将 2 mm×2 mm 的菌丝块接种于 PDA 和 SPPDA 平板上, 置 15 °C-20 °C 黑暗培养 40-60 d,

记录菌落形态,描述显微形态并测量分生孢子梗和分生孢子大小;在PD液体培养基中,20℃、120 r/min,培养30 d,取1 mL培养液涂布于PDA平板上,20℃、黑暗条件下培养21 d,置显微镜下观察分生孢子及分生孢子梗产孢特性并拍照。

1.6.2 分子生物学鉴定:中国被毛孢菌株 Cordy-007 (2006年分离自甘肃碌曲的冬虫夏草子座)在PDA平板上20℃培养20 d,刮取菌丝和分生孢子,采用Universal Genomic DNA Extraction Kit (大连宝生物工程有限公司)提取DNA。选用真菌通用引物ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和ITS5 (5'-GG AAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')扩增ITS基因。反应体系包括:10×buffer 2.5 μL, 1.5 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL, 20 μmol/L 引物各0.5 μL, Taq DNA polymerase (5 U/μL) 0.2 μL, 模板1 μL, ddH₂O 补足至25 μL。反应条件:95℃ 5 min; 56℃ 30 s; 72℃ 1 min; 95℃ 30 s; 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 10 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯照射下从凝胶中切取目的条带,经琼脂糖凝胶回收试剂盒(大连宝生物工程有限公司)纯化。用

pMD18-T载体进行克隆,取5 μL连接产物转化感受态大肠杆菌DH5α,涂布于含有X-Gal、IPTG、Amp的LB平板上,于37℃培养过夜,随机挑选白色菌落进行菌落直接PCR鉴定,确认载体中插入片段的长度大小(约600 bp)。提取阳性克隆的质粒送大连宝生物工程有限公司测序。测序结果在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>数据库进行BLASTn分析。

1.6.3 系统发育树的构建:从GenBank核酸序列数据库中下载冬虫夏草及虫草属相关菌株的ITS1-5.8S-ITS2序列,采用BioEdit进行核酸序列排序分析,用PAUP4.0软件进行发育树计算,利用Tree View 3.0构建系统发育树,并进行1 000次Bootstrap检验。

2 结果与分析

2.1 *Ophiocordyceps sinensis* 子座、子囊壳及子囊孢子形态

子座从病虫头部生出,褐色,长38 mm–78 mm,顶尖瘦削,不孕,可孕部(13–24) mm×(3–5) mm。每个病虫生一个子座,少数生2–4个子座;大多数子座不分枝,少数叉状分枝(图1)。



图1 冬虫夏草子座的形态多样性

Fig. 1 The morphological diversity of the stroma of *Ophiocordyceps sinensis* in Gansu Province

注: A–F: 产生2–4个子座或子座分枝的冬虫夏草; G: 产生一个子座的典型的冬虫夏草。标尺=10 mm.

Note: A–F: Born 2–4 stromata per endosclerotium or formed dichotomous stromata; G: Specimens with typical characteristics, born one stroma per endosclerotium. Bars=10 mm.

子囊壳深褐色, 表生或半埋生, 倒梨形至卵圆形, (316.8–504.9) μm × (148.5–267.3) μm ; 子囊细长, (247.5–420.0) μm × (7.4–10.0) μm ; 每个子囊中有子囊孢子 1–4 个; 自然弹射出的成熟的子囊孢子无色, 线形, 粗细均匀, 一端或两端略尖, 直或稍弯, 分隔多, 23–49 个隔膜, 每个子囊中弹射出的子囊孢子常聚集在一起, 孢子不断裂, (163.4–368.0) μm × (4.5–7.5) μm (图 2A–E)。

2.2 *Ophiocordyceps sinensis* 子囊孢子萌发特点

自然弹射的子囊孢子, 无色, 线形, 多隔, 粗细均匀, 24 h 后 (20 °C) 细胞不均匀膨大 (图 2F–H)。

涂布于 PSA 平板、15 °C–20 °C 培养, 子囊孢子于第 8 天开始萌发, 15 d 萌发率达 80% 以上。由于多个细胞萌发, 使得子囊孢子不同区段向不同方向曲折, 但子囊孢子从不断裂 (图 2I–K)。

玻片上水滴中于 15 °C–20 °C 培养的子囊孢子第 15 天开始萌发, 不形成菌丝, 而是形成分生孢子梗, 第 23–25 天产生分生孢子, 子囊孢子

保持弹射后 24 h 的孢子形态, 不因萌发产孢而折曲。

2.3 *Ophiocordyceps sinensis* 子座发育过程

冬虫夏草子座的发育速度随温度的升高而加快。在兰州, 移栽培育 4–5 d, 冬虫夏草子座可孕部开始发育, 可见略突起的子囊壳; 移栽培育 10–12 d, 子座成熟; 子囊孢子弹射期可持续约 15 d, 在此期间可见到可孕部出现明显的缩胀变化 (图 3)。在合作, 移栽培育 12–15 d, 子座成熟, 子囊孢子弹射期可持续约 25–28 d。

2.4 *Ophiocordyceps sinensis* 标样的组织分离

2002–2008 年从甘肃省境内的玛曲、碌曲、夏河、天祝共采集了 138 枚冬虫夏草标样进行了组织分离, 其中 127 枚典型地生有一个子座, 11 枚生有 2 或多个子座, 或子座分枝。不同批次标样中国被毛孢 *Hirsutella sinensis* 的分离率达 50%–100%; 生有 2 或多个子座或子座分枝的冬虫夏草标样中国被毛孢的分出率达 81.8% (表 1)。

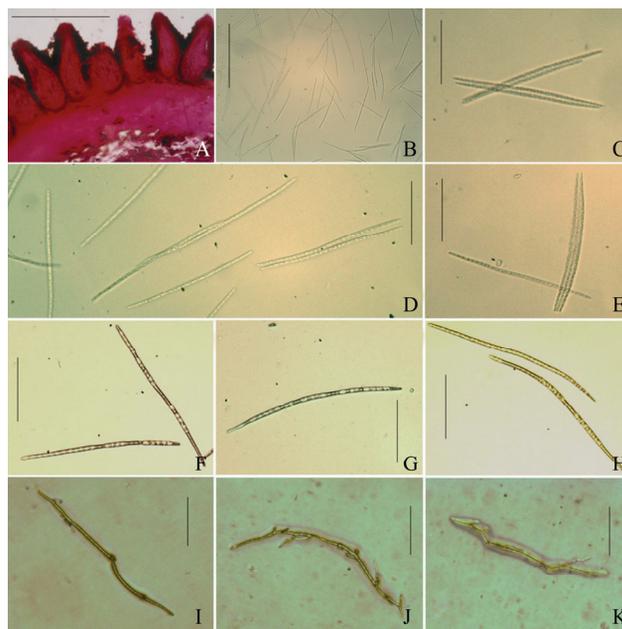


图 2 冬虫夏草的子囊壳、子囊孢子及子囊孢子萌发

Fig. 2 The observations of perithecia, ascospores and the germination of ascospores for *Ophiocordyceps sinensis*

注: A: 冬虫夏草的成熟的子囊壳 (乳酸品红染色); B–E: 自然弹射的子囊孢子, 每个子囊中弹射出的子囊孢子仍聚集在一起; F–H: 弹射出的子囊孢子, 24 h 后不均匀地细胞膨大 (20 °C); I–K: 在 PSA 平板上, 15 °C–20 °C, 培养 8–15 d, 子囊孢子萌发产生菌丝, 由于多个细胞萌发, 使得孢子不同区段向不同方向曲折, 但孢子从不断裂。标尺: A=500 μm ; B=350 μm ; 其它=100 μm 。

Note: A: Mature perithecia (stained by lactic acid fuchsin); B–E: Ascospores of naturally shot off, ascospores which shot off from same ascus still got together; F–H: Nonuniformly inflated ascospores, after shot off in 24 h, 20 °C; I–K: Ascospores germinating in 8–15 days at 15 °C–20 °C on PSA plate, germinated ascospores curved in the diverse directions at different segment, but ascospores never breaking up. Bars: A=500 μm ; B=350 μm ; others=100 μm .



图3 冬虫夏草子座不同发育阶段的形态观察(兰州, 2008)

Fig. 3 The morphological observations of developmental stages stroma of *Ophiocordyceps sinensis* (in Lanzhou, 2008)

注: A: 幼嫩的冬虫夏草子座(2008.05.15 采挖自甘肃碌曲); B: 可孕部开始发育, 可见略突起的子囊壳(移栽培育 5 d); C: 可孕部明显膨大, 子囊壳密集地产生(移栽培育 8 d); D: 成熟的子座, 不孕的顶部具深蓝色环(移栽培育 10 d); E,F: 子囊孢子弹射期的子座, 在一天中可孕部明显的缩胀变化(移栽培育 13 d, E 摄于上午 9:00, F 摄于下午 4:00); G,H: 子囊孢子弹射期的子座, 不孕的顶部深蓝色环呈现金属光泽(移栽培育 16 d, 19 d); I: 子座逐渐衰败, 腐生真菌开始在子座上生长(移栽培育 25 d).

Note: A: Young stroma (dug at 15.05.2008, from Luqū in Gansu Province); B: Fertility part began to developing (cultured 5d, after transplanted); C: Fertility part obviously inflated, perithecia were densely formed (cultured 8d, after transplanted); D: Mature stroma, mazarine ring was formed at sterile apical part (cultured 10 d, after transplanted); E,F: Stroma during ascospore ejection stage, the fertility part of stroma obviously produces alternation of contraction and expansion in one day (cultured 13 d, after transplanted. E: photographing at 9:00 am, F: at 4:00 pm); G,H: Stroma during ascospore ejection stage, mazarine ring was showed metallic luster at sterile apical part (cultured 16 d and 19 d, after transplanted); I: G gradually declined stroma, saprophytic fungi began to grow on it (cultured 25 d, after transplanted).

表 1 不同冬虫夏草样本中国被毛孢分离率

Table 1 Isolation ratios of *Hirsutella sinensis* from different samples of *Ophiocordyceps sinensis*

标本序号 Sample No.	采集地点 Location	海拔 Altitude (m)	采集时间 Time	标样数量 Numbers of specimen	不同部位中国被毛孢分离率		
					Percentage of <i>Hirsutella sinensis</i> from different sections (%)		
					子座 Stromata	内菌核 Endosclerotia	总体 Totals
1	玛曲 Maqū	3 500	2002.05	38	68.4	—*	68.4
2	碌曲 Luqū	3 900	2002.05	48	87.5	—	87.5
3	碌曲 Luqū	3 500	2006.05	10	90.0	50.0	90.0
4	玛曲 Maqū	3 500	2008.05	15	80.0	33.3	87.0
5	玛曲 Maqū	3 550	2008.05	7	100.0	28.6	100.0
6	碌曲 Luqū	3 900	2008.05	6	100.0	16.7	100.0
7	夏河 Xiahe	3 500	2008.05	4	50.0	10.0	50.0
8	天祝 Tianzhu	3 100	2008.05	10	25.0	75.0	75.0

注: —: 未试验.

Note: —: No tested.

2.5 *Hirsutella sinensis* 形态观察和分子生物学鉴定

参试的中国被毛孢菌株在 PDA 培养基上均可正常生长和产孢, 但生长速度慢, 在 PDA 平板上, 15 °C–20 °C 黑暗条件下培养 45 d, 菌落直径均小于 15 mm。菌落坚硬, 致密, 灰褐色至黄褐色, 表面有或无放射状纵纹, 产生黄褐色至暗褐色素渗入培养基中, 不同菌株的菌落形态、产色素及产孢能力存在较大差异(图 4)。

在 SPPDA 平板上 15 °C–20 °C 培养 40–60 d, 产孢细胞(小梗)无色, 分隔, 颈部针形或钻状, 光滑或具微疣, 有时颈部分叉, (19.9–74.7) $\mu\text{m} \times$ (2.0–5.0) μm [平均(38.3 \pm 12.1) $\mu\text{m} \times$ (3.2 \pm 0.8) μm]; 分生孢子单孢, 无色或近黑色, 肾形、长椭圆形或纺锤形, 单生、聚生或 2–8 个孢子生于胶质包被中, 无色孢子 (6.3–10.0) $\mu\text{m} \times$ (2.5–5.0) μm [平均(8.1 \pm 0.9) $\mu\text{m} \times$ (3.0 \pm 0.5) μm], 深色孢子 (6.3–13.0) $\mu\text{m} \times$ (3.0–5.0) μm [平均(9.3 \pm 1.7) $\mu\text{m} \times$ (4.0 \pm 0.6) μm]。分生孢子在自来水中 20 °C 培养, 24 h 开始萌发, 40 h 孢子萌发率达 5%–10% (图 5)。

Cordy-007 (GenBank 登录号 JF320822) 与 *Ophiocordyceps sinensis* (GenBank 登录号: AB067721.1, AB067716.1, AB067715.1, EU570952.1) 的 18S rRNA 部分序列, ITS1、5.8S rRNA、ITS 2 全序列, 及 28S rRNA 部分序列同源性达 99%。依据 ITS1-5.8S-ITS2 区序列构建的 Cordy-007 与冬虫夏草的系统发育树见图 6。

3 讨论

冬虫夏草为中国蛇形虫草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 寄生蝙蝠蛾科 Hepialidae 蝠蛾属 *Hepialus* 昆虫幼虫后产生的子座及被幼虫表皮包被着的菌核组成的复合体^[16], 邹志文等对中国蝠蛾属昆虫现行分类系统进行了修订, 将属于中国现行蝠蛾属的 62 个种分别归入拟蝠蛾属 *Parahepialus*、无钩蝠蛾属 *Ahamus*、蝠蛾属 *Hepialus* 及钩蝠蛾属 *Thitarodes* 等 4 个属中, 其中拟蝠蛾属 1 种、无钩蝠蛾属 18 种、蝠蛾属 1 种和钩蝠蛾属 40 种^[17]。甘肃省已报道的蝠蛾种类有碌曲无沟蝠蛾 *Ahamus luquensis*、玛曲无沟蝠蛾 *A. maquensis*、门源无沟

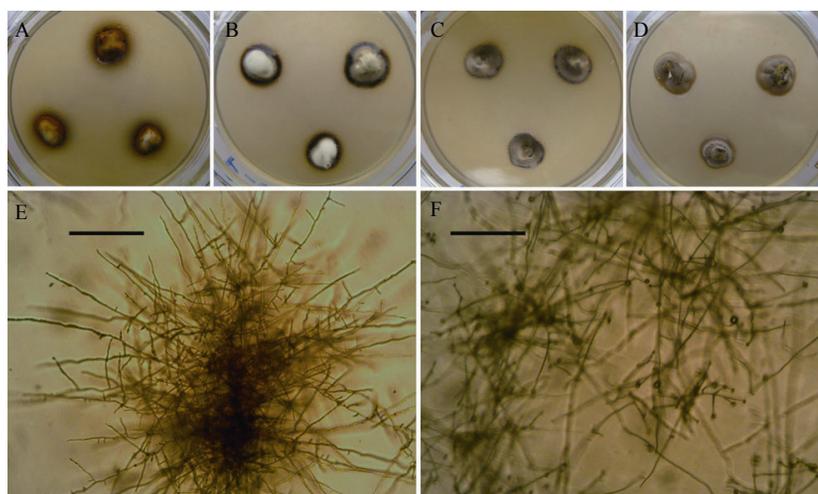


图 4 中国被毛孢菌落形态及产孢特征

Fig. 4 The characteristics of colonial morphology and conidia-production of *Hirsutella sinensis*

注: A–D: 中国被毛孢不同菌株菌落形态(在 PDA 上 15 °C–20 °C, 黑暗培养 45 d, 培养皿直径=60 mm; A: Strain Cordy-005; B: Strain Cordy-002, C: Strain Cordy-006; D: Strain Cordy-008); E,F: 中国被毛孢不同菌株产孢特性(在 PSA 平板上 20 °C, 黑暗培养 21 d; E: Strain Cordy-2, 尚未产孢的菌株; F: Strain Cordy-004, 已大量产孢的菌株)标尺=200 μm 。

Note: A–D: Colony morpha of different strains (cultured 45 d, on PDA plate, 15 °C–20 °C, in the dark, plate diameter=60 mm; A: Strain Cordy-005, B: Strain Cordy-002, C: Strain Cordy-006, D: Strain Cordy-008); E,F: Conidia-producing capacity of different strains (cultured 21 d, on PSA plate, 20 °C, in the dark; E: Strain Cordy-002, having no conidia; F: Strain Cordy-004, producing plenty conidia) Bars=200 μm .

蝠蛾 *A. menyuanicus*、玉树无沟蝠蛾 *A. yushuensis*、虫草沟蝠蛾 *Thitarodes armoricanus* 和白带沟蝠蛾 *T. cingulatus* 等, 其中玉树无沟蝠蛾和门源无沟蝠蛾是甘肃省甘南藏族自治州境内的西倾山、积石山一带的优势寄主昆虫^[17-18]。寄主昆虫的大小和颜色直接影响虫草内菌核和子座的大小和色泽。一般来说, 寄主昆虫的虫体越大, 产生的子座也越粗壮。多子座和分枝子座的产生原因尚不明了。根据杨大荣等的研究, 在我国, 95%的蝠蛾种类分布区域十分狭窄, 常常是不同山脉就形成不同的种类, 甚至是同一山脉不同坡向、不同海拔就会形成完全不同的种类^[19], 在本研究中, 所有采样点都采集到了多子座或子座分枝的冬虫夏草标样, 从这一点来看, 多子座和分枝子座的产生应该与寄主昆虫的种类无关。

不同产地冬虫夏草标样, 每个子囊中有子囊孢子 1-8 个不等, 但以 2 个和 4 个的为多^[12]; 子囊孢

子的大小及其所具有的隔膜数也存在较大的差异^[14], 来自海拔 4 550 m 的喜马拉雅北坡的冬虫夏草标样, 子囊孢子可达(310.0-350.0) $\mu\text{m} \times (4.0-7.0) \mu\text{m}$, 孢子的隔膜数可达 51-93^[20]; 采自甘肃碌曲的冬虫夏草, 子囊孢子大小为(163.4-368.0) $\mu\text{m} \times (4.5-7.5) \mu\text{m}$, 隔膜数 23-49。在子囊孢子弹射期, 子座可孕部产生明显的缩胀变化。

在本研究中, 自然弹射的子囊孢子, 无色, 线形, 多隔, 粗细均匀, 24 h 后细胞不均匀膨大, 孢子不断裂。此结果不同于李黎等^[21]的报道: 冬虫夏草刚弹射出的子囊孢子大多数无隔, 2 d 后出现明显分隔。

分离自甘肃甘南冬虫夏草标样的中国被毛孢菌株, 培养特征和产孢细胞的形态特征与已有报道^[22-24]基本一致, 不同的是, 所有参试菌株在 SPPDA、PDA 和 PSA 培养基上均可产生无色和近黑

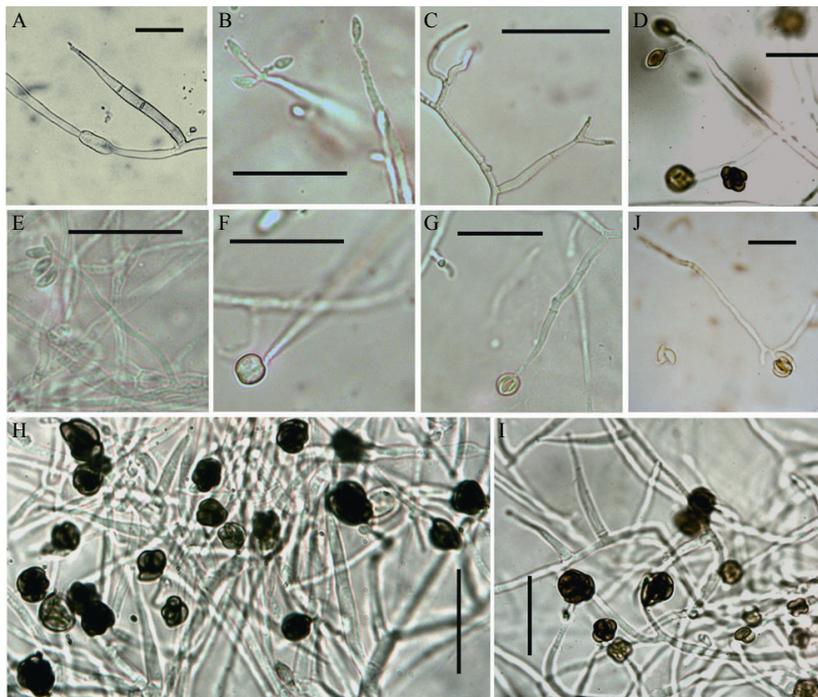


图 5 中国被毛孢分生孢子梗及分生孢子形态多样性

Fig. 5 The morphological diversity of conidiophores and conidia of *Hirsutella sinensis*

注: A-I: 示分生孢子梗, 产孢细胞和分生孢子的形态(在 SPPDA 平板上, 20 °C 黑暗培养 40-60 d); J: 分生孢子在自来水中 40 h 孢子萌发状。标尺: A, D, J=20 μm ; B, E-I=30 μm ; C=50 μm 。

Note: A-I: Morpha of conidiophores, conidiogenous cells and conidia, showing the details of phialides and conidial masses (cultured 40-60 d, on SPPDA plate in the dark, at 20 °C); J: Germed conidia at 20 °C 40 h in tap water. Bars: A, D, J=20 μm ; B, E-I=30 μm ; C=50 μm 。

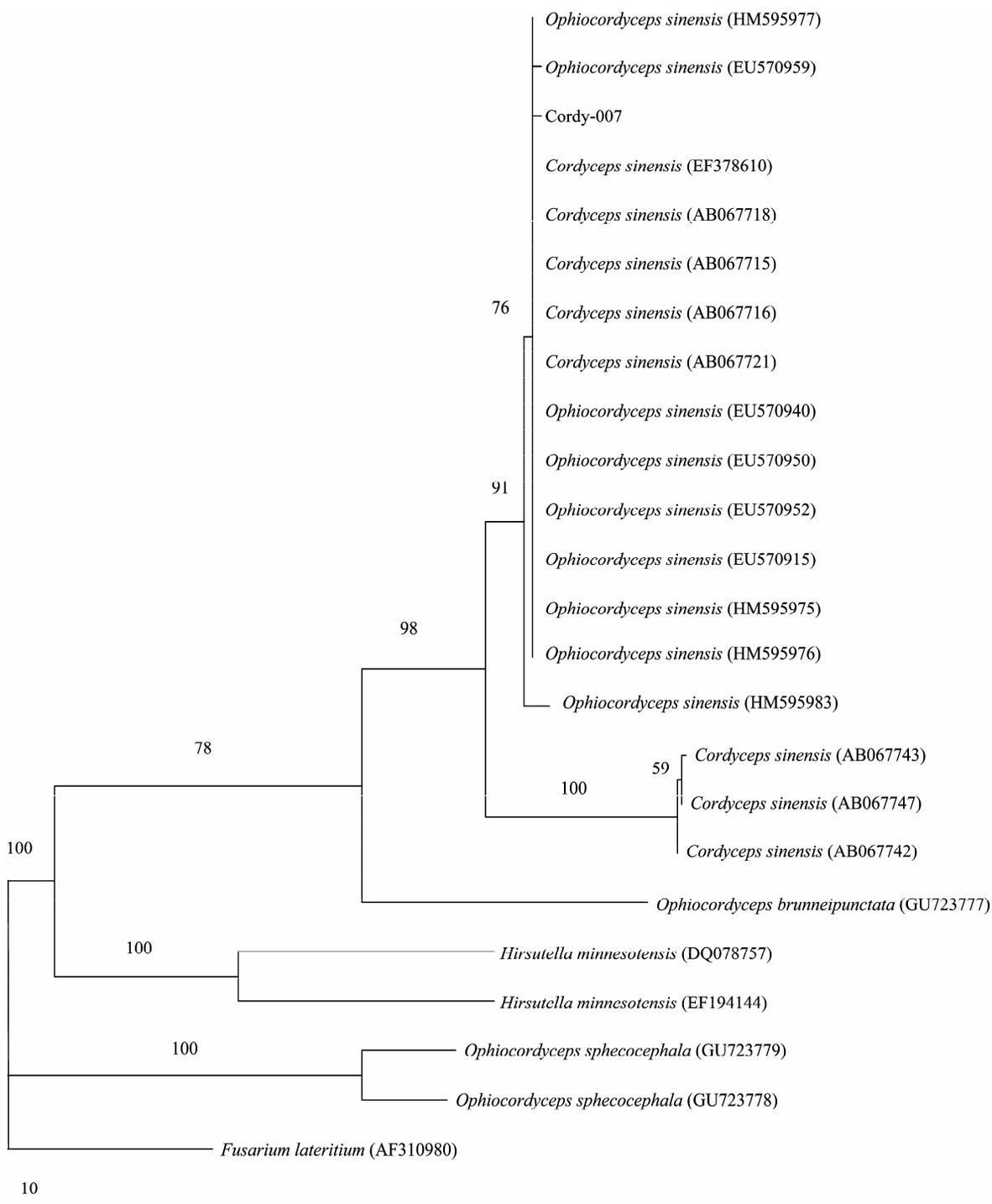


图 6 依据 ITS1-5.8S-ITS2 区序列构建的 Cordy-007 与冬虫夏草的系统发育树

Fig. 6 Molecular phylogenetic tree inferred from the rDNA-ITS (ITS1-5.8S-ITS2) sequences Cordy-007 (obtained from this study) and GenBank nominated as *Ophiocordyceps sinensis* or *Cordyceps sinensis*

注: 分支上的数据表示 Bootstrap 检验的支持百分率; 括号内为菌株的 GenBank 序列号; 标尺参数表示进化距离。

Note: The confidence values of 50 or above from 1 000 replicate bootstrap samplings are shown at each node. GenBank accession numbers are shown in the parentheses. Bar: Distance corresponding to 10 base changes per 100 nucleotide positions.

色两种颜色的分生孢子,且深色孢子在刚产生时就显现出较深的颜色,两种颜色孢子的比例在不同菌株间有较大差异。

中国被毛孢 *Hirsutella sinensis* 菌株 Cordy-007 的分子生物学鉴定结果显示, Cordy-007 与冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 为同一物种, *Hirsutella sinensis* 高的分离率和子囊孢子的微循环产孢也再次证明 *Hirsutella sinensis* 即是 *Ophiocordyceps sinensis* 的无性型。

研究结果再次印证冬虫夏草和中国被毛孢具有丰富的形态多样性,与形态多样性相对应的分子水平的差异有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 戴玉成,李玉. 中国六种重要药用真菌名称的说明[J]. 菌物学报, 2011, 30(4): 515-518.
- [2] Zhu JS, Halpern GM, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* part I[J]. J Altern Complement Med, 1998, 4(3): 289-303.
- [3] 陈仕江,钟国跃,马开森. 冬虫夏草资源可持续利用的思考[J]. 中国草地学报, 2010, 32(Z1): 44-47.
- [4] 李建民,李福安. 浅谈青海冬虫夏草的研究进展[J]. 青海医药杂志, 2004, 34(8): 59-61.
- [5] Sharma S. Trade of *Cordyceps sinensis* from high altitudes of the Indian Himalaya: Conservation and biotechnological priorities[J]. Current Science, 2004, 86(12): 1614-1619.
- [6] 章力建,李兵,胡育骄. 中国冬虫夏草资源管理概况[J]. 中国草地学报, 2010, 32(Z1): 1-5.
- [7] 杨大荣,彭艳琼,陈吉岳,等. 中国冬虫夏草分布格局与环境变化对其分布的影响[J]. 中国草地学报, 2010, 32(Z1): 22-27.
- [8] Zhang KY, Wang CJ, Yan MS. A new species of *Cordyceps* from Gansu, China[J]. Trans Mycol Soc Japan, 1989, 30: 295-299.
- [9] Zang M, Yang DR, Li CD. A new taxon in the genus *Cordyceps* from China[J]. Mycotaxon, 1990, 37: 57-62.
- [10] Zang M, Kinjo N. Notes on the alpine *Cordyceps* of China and nearby nations[J]. Mycotaxon, 1998, 66: 215-229.
- [11] 康冀川,梁宗琦,刘爱英,等. 虫草多型性现象的 5.8S rDNA 和 ITS2 序列测定研究[J]. 菌物系统, 2000, 19(4): 492-497.
- [12] 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, 68.
- [13] 蒋毅,姚一建. 虫草属分子系统学研究现状[J]. 菌物研究, 2004, 2(1): 58-67.
- [14] Shrestha B, Zhang WM, Zhang YJ, et al. What is the Chinese caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae)?[J]. Mycology, 2010, 1(4): 228-236.
- [15] 赵忠,王建强,杨鹏翼. 甘肃省冬虫夏草资源保护管理对策[J]. 中国草地学报, 2010, 32(Z1): 28-30.
- [16] 刘茵华. 对《中国药典》2000年版中冬虫夏草形态描述的高榷[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(8): 639.
- [17] 邹志文,刘昕,张古忍. 中国蝠蛾属(鳞翅目,蝙蝠蛾科)现行分类系统的修订[J]. 湖南科技大学学报: 自然科学版, 2010, 25(1): 114-120.
- [18] 马启龙,王忠,马福全. 甘肃虫草寄主昆虫的种类鉴定[J]. 甘肃农业科技, 1995(12): 35.
- [19] 杨大荣,李朝达,舒畅,等. 中国蝠蛾属昆虫的种类和地理分布研究[J]. 昆虫学报, 1996, 39(4): 413-422.
- [20] Kinjo N, Zang M. Morphological and phylogenetic studies on *Cordyceps sinensis* distributed in southwestern China[J]. Mycoscience, 2001, 42(6): 567-574.
- [21] 李黎,尹定华,陈仕江. 康定冬虫夏草子囊孢子的生长发育[J]. 重庆中草药研究, 2001(43): 32-33, 25.
- [22] 刘锡璠,郭英兰,俞永信,等. 冬虫夏草菌无性阶段的分离和鉴定[J]. 菌物学报, 1989, 8(1): 35-40.
- [23] 郭英兰. 中国被毛孢形态特征订正[A]//加入 WTO 和中国科技与可持续发展——挑战与机遇、责任和对策(上册)[C]. 2002: 372.
- [24] 梁宗琦,刘爱英,刘作易. 中国真菌志·第三十二卷 虫草属[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 1-232.