

## 冬虫夏草促繁地土壤真菌种群结构的变性梯度凝胶电泳技术分析

李 挺, 宋 斌\*, 王超群, 李泰辉

广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东省华南应用微生物重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 广东 广州 510070

**摘要:** 目的 采用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术对冬虫夏草促繁地土壤真菌多样性进行初步研究。方法 利用 PCR 方法选择特异性引物 ITS3-GC 和 ITS4 扩增 ITS rDNA 基因的 ITS2 片段, 结合 DGGE 分离技术, 并借助生物信息学软件进行分析。结果 所测的土壤样品中真菌 ITS2 基因序列与 GenBank 已报道的丝盖伞属 *Inocybe* (Fr.) Fr.、口蘑属 *Tricholoma* (Fr.) Staude、根肿黑粉菌属 *Entorrhiza* C.A. Weber 及未确定的子囊菌 *Ascomycota*、土壤真菌等的序列相似性较高, 土壤真菌种群结构相似性仅有 19.4%~50.1%。结论 冬虫夏草促繁地土壤真菌多样性丰富。

**关键词:** 冬虫夏草; 土壤; 真菌; 多样性; 变性梯度凝胶电泳技术

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)04-0478-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.04.021

## Analysis on soil fungal community structures in propagation of *Cordyceps sinensis* by denaturing gradient gel electrophoresis

LI Ting, SONG Bin, WANG Chao-qun, LI Tai-hui

State Key Laboratory of Applied Microbiology Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

**Key words:** *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; soil; fungi; diversity; denaturing gradient gel electrophoresis

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 是中国传统珍稀中药材品种, 主产于青海、西藏等海拔 3 600~5 000 m 的部分地区, 具有补肺益肾, 止咳化痰、调节免疫功能等功效, 对乙型肝炎、慢性肾衰竭等有特殊疗效, 产品远销东南亚、欧美等地, 市场潜力极大<sup>[1-2]</sup>。然而冬虫夏草天然产量有限, 无法人工栽培, 长期的滥采乱挖, 导致冬虫夏草适宜生长区域不断缩小, 资源已濒临枯竭。目前冬虫夏草已被列为国家二级保护物种<sup>[3]</sup>。因此, 开展冬虫夏草产地生态环境的调查、冬虫夏草的繁育等研究, 对冬虫夏草资源的有效保护与合理利用都具有重要的意义。冬虫夏草生态环境中所存在的许多真菌种群与冬虫夏草的形成与发育过程可能相关, 这些真菌是冬虫夏草真菌区系的重要组成部分, 对它们的深入研究有助于冬虫夏草人工繁育。

大武镇位于青海省东南部的玛沁县, 是果洛藏

族自治州州府所在地, 地处青藏高原腹地, 平均海拔 4 000 m 以上, 高寒缺氧, 气候恶劣, 生态类型特殊, 是青海冬虫夏草的主要产地<sup>[4-5]</sup>。本实验利用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术对大武镇冬虫夏草促繁地土壤真菌种群结构进行研究, 为深入开展冬虫夏草的人工繁育提供科学依据。

### 1 材料

#### 1.1 土壤样品

土壤样品(表 1)取自大武镇山区, 坐标 99°06'~99°07'E, 34°14'~34°15'N, 采样时间为 2010 年 8 月 3 日, 每个点取样量 300 g 土壤, 装入灭菌的封口聚乙烯袋中, 低温保存备用。

#### 1.2 试剂和仪器

水饱和酚、三氯甲烷、Tris-HCl、EDTA、SDS、Hot Taq DNA 聚合酶等试剂购自广州东盛生物科技

收稿日期: 2012-06-11

基金项目: 中国科学院知识创新项目 (KSCX2-YW-G-074-04, KSCX2-YW-G-076)

作者简介: 李 挺 (1983—), 男, 广东省微生物研究所助理研究员, 主要从事真菌微生物学研究, 发表论文 5 篇。

\*通信作者 宋 斌 E-mail: ganoderma@vip.163.com

网络出版时间: 2013-01-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130116.1025.003.html>

表1 土壤采集信息

Table 1 Information on collected soil

编号	海拔 / m	pH 值	深度 / cm
1	4 200±10	7.5~7.6	0~10
2	4 200±10	7.5~7.6	10~20
3	4 000±10	6.8~7.2	0~10
4	4 000±10	6.8~7.2	10~20
5	3 800±10	4.2~5.0	0~10
6	3 800±10	4.2~5.0	10~20

有限公司。土壤 DNA 提取试剂盒购自 Mo Bio 生物公司，DNA 回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Promega 公司。PCR 引物 ITS1、ITS4、ITS5、ITS3GC 由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增仪为美国 ABI Gene Amp PCR9700。变性梯度凝胶电泳为美国 Bio-Rad The Dcode TM Universal Mutation System。

## 2 方法

### 2.1 土壤 DNA 提取

将土壤冷冻抽干前处理，提取方法参照 Power Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio) 使用说明。

### 2.2 巢式 PCR

第1次 PCR: 所用引物为真菌 ITS rDNA 通用引物 ITS4 和 ITS5 (表2)。反应体系为 25 μL 总体积，ddH<sub>2</sub>O 12.8 μL，10 倍缓冲液 (Mg<sup>2+</sup>) 8 μL，dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL，ITS4 (10 μmol/L) 0.5 μL，ITS5 (10 μmol/L) 0.5 μL，Hot Taq (5 u/μL) 0.2 μL，模板 DNA 1 μL。反应程序为 94 °C、5 min 预变性，94 °C、1 min，54 °C、1 min，72 °C、2 min，30 个循环，72 °C、8 min。

第2次 PCR: 第1次 PCR 产物 1:100 稀释后作模板进行，所用引物为 ITS1 和 ITS4 (表2)，反应体系同上。反应程序为 94 °C、2 min 预变性，94 °C、45 s，58 °C、1 min，72 °C、45 s，30 个循环，72 °C、8 min。

第3次 PCR: 第2次 PCR 产物 1:100 稀释后作模板进行，所用引物为 ITS3-GC 和 ITS4 (表2)，

表2 巢式 PCR 引物

Table 2 Nest PCR primers

引物	序列
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS3-GC	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGG -GCACGGGGGCGATCGATGAAGAACGCAGC

反应体系同上。反应程序为 94 °C、2 min 预变性，94 °C、45 s，55 °C、1 min，72 °C、45 s，30 个循环，72 °C、8 min。

### 2.3 DGGE 电泳分析

**2.3.1 变性胶的制备** 使用梯度胶制备装置，制备变性剂浓度从 35%~65% (100%变性剂为 7 mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺的混合物) 的 8%聚丙烯酰胺凝胶，其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增。

**2.3.2 PCR 样品的加样** 待胶完全凝固后，将胶板放入装有电泳缓冲液的装置中，在每个加样孔加入含有 10%加样缓冲液的 PCR 样品 20~25 μL。

**2.3.3 电泳及染色** 在 120 V 的电压下，60 °C 电泳 5 h。电泳完毕后，将凝胶在 EB 中染色 20~30 min。照相及观察将染色后的凝胶在紫外成像仪下观察。

**2.3.4 PCR 产物的电泳条带的分析** 采用 Quantity One 分析软件 (Bio-Rad) 通过分析样品电泳条带的多少来比较各个土壤样品的真菌多样性的一些基本指标。对各样品条带的迁移率、灰度及数量进行定量分析。根据各样品在 DGGE 图谱中的表现对其相似性以 UPGMA 法进行聚类分析。

### 2.4 基因克隆和序列分析

从 DGGE 条带中回收 DNA，采用 Promega 公司的试剂盒切胶回收 PCR 产物后，取 1 μL 回收的 PCR 产物、1 μL PMD18-Tvector、5 μL LigationMix，补充 3 μL dH<sub>2</sub>O，16 °C 连接过夜。取连接产物 10 μL 转化到 100 μL *E. coli* top10 感受态细胞。取 400 μL 转化产物涂布于含 LB (AMP/X-GAL/IPTG) 平板培养基的筛选平板上，37 °C 正面向上放置 30 min 后倒置培养 12~16 h。挑取白色菌落，作菌落 PCR 鉴定。将筛选得到的阳性克隆，送上海生工进行测序。序列在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上进行 BLAST 比对，提交序列。

## 3 结果与分析

### 3.1 土壤总 DNA 的提取和 ITS2 的巢式 PCR 扩增

提取的土壤总 DNA 经巢式 PCR 扩增后，产物用 1.0%琼脂糖凝胶进行电泳。样品在第1次 PCR 产物的电泳检测中，没有目标带，而通过第2次 PCR 可得到明显目标产物 (约 600 bp)。样品第3次 PCR 的产物即引物 ITS3 和 ITS4 用于扩增 5.8 S rDNA 和 28 S rDNA 之间的转录间隔区 ITS2 片段大小为 400 bp，浓度较高 (图1)，无非特异性扩

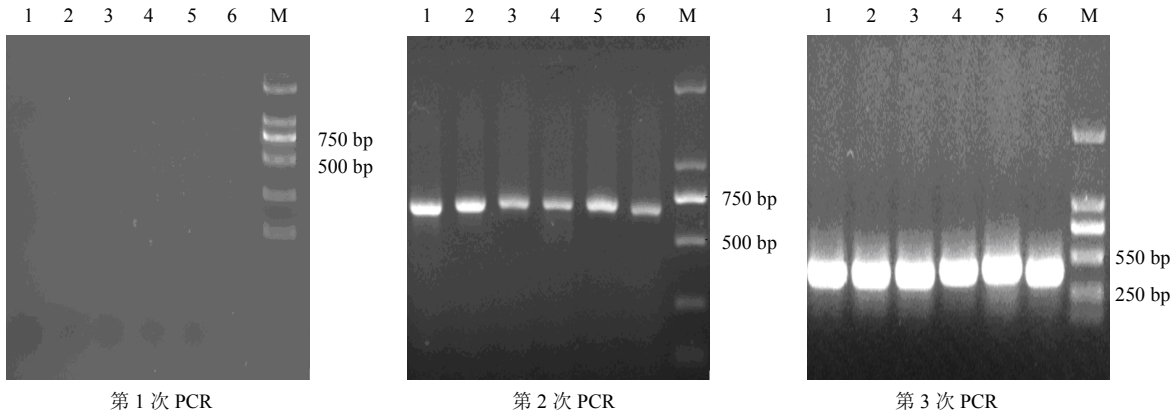


图 1 6 份样品 ITS 片段 3 次巢式 PCR 扩增结果

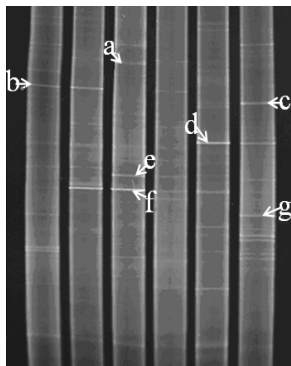
Fig. 1 Amplification results of 3-plex nest PCR of ITS segments of six soil samples

增现象，满足 DGGE 的要求。可见，在靶模板很少的情况下，通过巢式 PCR 的放大作用能获得较好目标产物。

### 3.2 土壤样品 ITS2 片段的 DGGE 指纹图谱

图谱显示 6 份土壤样品的 ITS2 rDNA 片段 PCR 产物经变性梯度凝胶分离后，出现的条带有一定差别，条带数从 16~27 条不等，表明各样品的土壤真菌种群具有多样性；各条带的强度和迁移率不同，说明每个样品真菌的优势种群不同（图 2）。

以土壤样品 1 谱带为标准，结果显示，所有样品之间的相似性在 19.4%~50.1%，说明不同土壤样品真菌的种群结构有较大差异。其中样品 1 和 2、样品 3 和 4、样品 5 和 6 分别聚类在一起（图 3），显示它们之间具有相似的种群结构；样品 1 和 2 之间的真菌种群相似性最高，为 50.1%，而样品 1 和 6 则相似性较小，仅为 19.4%。



a~g—基于 ITS2 片段的 DGGE 的 7 条主带  
a—g—the seven main bands in DGGE fingerprint based on ITS2

图 2 6 份土壤样品的 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE fingerprint of six soil samples

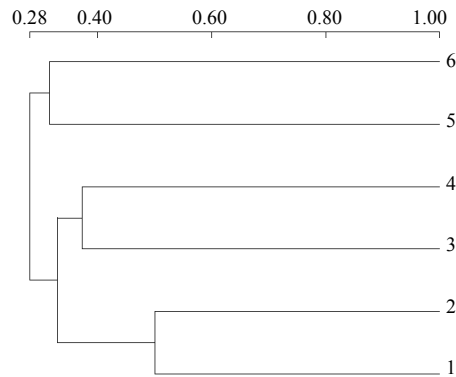


图 3 6 份土壤样品真菌种群的 DGGE 聚类分析  
Fig. 3 Cluster analysis of fungal communities in six soil samples using DGGE

### 3.3 土壤样品 ITS2 片段的克隆和序列的 BLAST 分析

分别挑取 DGGE 电泳图中 7 个明显的条带 a~g，切胶回收后进行克隆、测序和 BLAST 分析（图 2）。结果显示，条带 a、b、e 与 GenBank 数据库中未确定的土壤真菌的 ITS 序列的相似性较高，条带 c、g 与丝盖伞属 *Inocybe* (Fr.) Fr. 真菌相似性较高，d 与根肿黑粉菌属 *Entorrhiza* C.A. Weber 真菌相似，f 与巨大口蘑 *Tricholoma giganteum* Masee 相似性较高（表 3）。序列提交在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，登录号为 JF523347~JF523354。

### 4 讨论

DGGE 技术已广泛应用于微生物多样性研究，但主要是针对原核生物多样性分析，分析的片段集中在原核生物 16 S rDNA V3 区基因，大小约 250 bp<sup>[6]</sup>，而真菌分析的片段主要集中在 18 S rDNA 基因 V1~V3 区<sup>[7-8]</sup>。Anderson 等<sup>[9]</sup>认为在土壤真菌多

表3 土壤真菌 ITS2 rDNA 片段序列比对结果

Table 3 Comparison on sequences of ITS2 rDNA segments of soil fungi

条带序号	基因登录号	ITS2 rDNA 比对最相近序列	相似率 / %
a	JF523354	未确定的子囊菌 (HQ433028)	99
b	JF523347	未确定的土壤真菌 (FJ213503)	98
c	JF523353	沙地丝盖伞 (FN550888)	88
d	JF523351	芬纳兰根肿黑粉菌近似种 (DQ645527)	86
e	JF523349	未确定的真菌克隆 (FJ237094)	99
f	JF523348	巨大口蘑 (EU051917)	99
g	JF523352	茶褐丝盖伞 (HQ604621)	98

样性的研究中, 由于 18 S rDNA 引物所扩增的片段具有较高的保守性, 并不能对全部的真菌进行有效的扩增, 所以选用 ITS 引物要优于 18 S rDNA 引物。Guedegbe 则采用了 ITS1/ITS4-GC 片段研究蚁巢真菌的多样性, 证明用 ITS 片段考察真菌种类多样性是很好的选择<sup>[10]</sup>。一般 DGGE-PCR 产物的长度在 500 bp 以下, 否则 DGGE 的分辨率会下降<sup>[11]</sup>。本研究采用 ITS4/ITS3-GC 引物扩增 ITS2 片段, 大小约 400 bp, DGGE-PCR 分离效果较好, 可用于土壤真菌种类多样性和丰度的定量分析。

对大武镇土壤样品真菌研究, 发现了冬虫夏草促繁地土壤真菌种类至少有丝盖伞属 *Inocybe* (Fr.) Fr.、口蘑属 *Tricholoma* (Fr.) Staude、根肿黑粉菌属 *Entorrhiza* C. A. Weber 的种类, 它们属于世界广布属、温带属、北温带属, 在青海都有分布<sup>[12]</sup>; 对许多的未能确定的真菌类群, 如条带 a 是一种未确定的子囊菌, 还需要作进一步的深入研究。

对大武镇冬虫夏草促繁地土壤真菌多样性的初步研究表明, 利用 ITS rDNA 分子片段鉴定真菌需要 GenBank 数据库的完善, 或对未能确定的真菌应用其他分子生物学手段, 诸如 RAPD、ISSR 等分子标记技术的综合研究, 以明确冬虫夏草生境土壤真菌的区系特征。

参考文献

[1] 青海百科全书编纂委员会. 青海百科全书 [M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 1998.  
 [2] 王 征, 刘建利. 冬虫夏草化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1157-1160.  
 [3] 郭英兰, 肖培根, 魏江春. 论冬虫夏草生物学与可持续

利用 [J]. 中国现代中药, 2010, 12(11): 3-8.  
 [4] 莫申国, 张百平, 程维明, 等. 青藏高原的主要环境效应 [J]. 地理科学进展, 2004, 23(2): 88-96.  
 [5] 周明秀. 果洛州冬虫夏草资源分布及其利用 [J]. 青海畜牧兽医杂志, 2004, 34(3): 37-38.  
 [6] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, et al. Microbial diversity and soil functions [J]. *Eur J Soil Sci*, 2003, 54: 655-670.  
 [7] Vainio E J, Hantula J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA [J]. *Mycol Res*, 2000, 104(8): 927-936.  
 [8] Miruna O S, Newton C M, Gabriele N. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities [J]. *J Microbiol Methods*, 2006, 65(1): 63-75.  
 [9] Anderson I C, Campbell C D, Prosser J I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil [J]. *Environ Microbiol*, 2003, 5(1): 36-47.  
 [10] Guedegbe H J, Miambi E, Pando A. Occurrence of fungi in combs of fungus-growing termites (Isoptera: Termitidae, Macrotermitinae) [J]. *Mycol Res*, 2009, 113: 1039-1045.  
 [11] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity [J]. *Bacteriology*, 1998, 180(18): 4765-4774.  
 [12] 卯晓岚. 中国大型真菌 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.