

利用 rRNA 基因 ITS 1、5.8S、ITS 2 區域核酸序列鑑別冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.) 之研究

陳志昇 凌啟鴻 許瑞祥*

國立台灣大學微生物與生化學研究所

(接受刊載日期: 中華民國九十二年九月九日)

冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.) 自古為我國滋肺補腎的珍貴藥材。目前已確認冬蟲夏草無性世代為中國被毛孢 (*Hirsutella sinensis*)，但各不同產地冬蟲夏草的種源關係及種或品種的鑑定仍無法由目前的分類指標來區別。本試驗中以 rRNA 基因 ITS 1 (internal transcribed spacers 1)、5.8S、ITS 2 區域序列進行冬蟲夏草類源關係的探討，由序列分析與基因庫資料比對的結果顯示冬蟲夏草可分成兩群，第 I 群與 *H. sinensis* (HMAS55469) ITS 區序列相同度 (identity) 為 98.9%；第 II 群與 *H. sinensis* (HMAS55469) ITS 區序列相同度為 61.8%。利用 18S rRNA 基因 NS3/NS6 區域核酸序列所確認同種的冬蟲夏草樣品，可進一步以 ITS 1、5.8S、ITS 2 區域核酸序列區分成兩群。

關鍵字：冬蟲夏草，rRNA 基因，中國被毛孢 (HMAS55469)。

Differentiation of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. with Internal Transcribed Spacer 1, 5.8S and Internal Transcribed Spacer 2 rRNA Gene Sequences

Chih-Sheng Chen, Chi-Hung Ling and Ruey-Shyang Hseu*

Graduate Institute of Microbiology and Biochemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

(Accepted for publication: September 9, 2003)

Cordyceps sinensis (Berk.) Sacc. is a treasured herb in Chinese medicine, a tonic for the lung and kidney. The anamorph of *C. sinensis* was identified as *Hirsutella sinensis*. But the identification of *C. sinensis* at the species level or below the species level using the traditional method based upon morphological observation is difficult. The phylogenetic relationship between *C. sinensis* samples was analyzed based on internal transcribed spacers 1 (ITS 1), 5.8S, and ITS 2 rRNA gene region sequences in this study. The results revealed that *C. sinensis* was divided into two clusters. The sequence identities of cluster I and *H. sinensis* (HMAS55469) were around 98.9%. However, the sequence identity of cluster II and *H. sinensis* (HMAS55469) was around 61.8%. The *C. sinensis* samples identified in the 18S rRNA gene NS3/NS6 regions at the species level could be further divided into two groups by using ITS 1, 5.8S, and ITS 2 rRNA gene sequences.

Key words: *Cordyceps sinensis*, rRNA gene, ITS, *H. sinensis* (HMAS55469).

前 言

「冬蟲夏草」一詞首見於清朝汪昂所著的本草備要中：「冬蟲夏草、甘平、保肺益腎、止血化痰已癆咳……」。可知在 300 年前傳統醫藥對冬蟲夏草功效已有初步認識⁽¹⁾。至 1878 年義大利學者 Saccardo 才將冬蟲夏草正式經拉丁

文命名為 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.。冬蟲夏草屬 (*Cordyceps*) 為廣泛分布的昆蟲寄生性真菌之一。目前已發表的種類超過 400 種^(2,3)。做為傳統珍貴藥材的冬蟲夏草僅分布於中國青海、西藏、四川、雲南等海拔 3,000-5,000 公尺的高寒山區。由於天然條件的限制，產量有限，因此，價格昂貴，成為稀世奇珍。現代的

* Corresponding author. E-mail: rshseu@ccms.ntu.edu.tw

藥理研究證實冬蟲夏草除增強免疫功能、抗腫瘤、保護損傷肝臟、擴張離體氣管與抗腎炎外，並有抗衰老和雄性激素的作用，臨床研究用以治療肺結核、咳嗽、神經衰弱、病後體虛、慢性腎炎、慢性肝炎、性功能障礙與老年性疾病等^(4,5)。

過去從中國主要冬蟲夏草產地所分離的無性世代菌株，超過十種以上的真菌。因此，有人認為冬蟲夏草可能是數種真菌寄生於相同寄主蟲草蝙蝠蛾後，所形成類似的有性世代。亦即是指由不同物種來源的菌核與子座所形成外觀形態相似的子實體都叫冬蟲夏草，如此亦能方便說明其無性世代菌株的多樣性⁽⁶⁾。冬蟲夏草的有性世代與無性世代是其生活史發育的不同階段，雖然形態不同，但是所具有的基因型是一致的，因此，經由特定基因(如：rRNA 基因)的分析，比較冬蟲夏草子實體與其分離菌株間基因的相似性，可釐清兩者間的對應關係⁽⁷⁾。

在物種分類鑑定上最常用來分析的基因是 rRNA 基因，它具有高複製倍數和演化過程中高保留性等優點⁽⁸⁾。陳與許⁽⁷⁾發表自 30 號標本中歸納整理的結果顯示，野生的冬蟲夏草無論其菌核或子座在 18S rRNA 基因中皆具有相同的限制酶 *Cfo* I、*Rsa* I 水解圖譜，可以與蟲草屬中其他種類明確的區別。此結果顯示冬蟲夏草是由同一物種感染形成者，無性世代與有性世代的單一對應關係是存在的。

趙等人⁽⁹⁾發表以 rRNA 基因中的 ITS 1 區間作為冬蟲夏草菌種分子鑑別的指標，文中亦認為冬蟲夏草僅應有一種無性型，並將流行較廣的中國擬青黴的可能性排除在外，認為此區中的基因序列以中國被毛孢與野生冬蟲夏草的相似性最高。李等人⁽¹⁰⁾發表以 RAPD-PCR 所得的基因指紋圖譜來比較野生蟲草和其分離的無性世代菌株間基因組成的一致性，結果顯示採集自青海的冬蟲夏草其 RAPD-PCR 圖譜與中國被毛孢的基因指紋圖譜相似率達 96% 以上，顯示兩者的基因型是一致的。同時進行與中國擬青黴、中國金孢黴、蟲生簇孢的平行比較時發現它們的 RAPD-PCR 基因指紋圖譜與野生的冬蟲夏草相似性很低，因而排除了他們作為冬蟲夏草無性世代菌株的可能性。Chen 等人⁽¹¹⁾發表以 rRNA 基因中 ITS 與其中 5.8S 的核酸序列分析比較西藏所採集的冬蟲夏草與部分無性世代菌種間的差異性，除了顯示此區間野生冬蟲夏草與中國被毛孢菌株間的一致性外，並將中國擬

青黴與 *Stachybotrys*、*Tolypocladium*、*Verticillium* 等屬作為蟲草無性世代的可能性排除。Liu 等人⁽¹²⁾發表採集自雲南白馬雪山的冬蟲夏草標本與此標本分離而得的無性世代菌株中國被毛孢間，具有相同的 rRNA 基因 ITS 核酸序列，並經由微循環產孢構造的觀察證實兩者間形態的相似性。同時文中並以 ITS 核酸序列的相似性推論 *C. multiaxialis* 與 *C. nepalensis* 應為冬蟲夏草 *Crocyceps sinensis* 的同物異名。Kinjo 等人⁽¹³⁾發表採集自中國西南山區 11 個冬蟲夏草樣品，其 rRNA 基因之 ITS1、2 和 5.8S 區間核酸序列顯示為相同群聚的基因組成，作者認為應是相同物種，但在其中又可分為兩個亞群。作者比對基因資料庫的記錄後，確定其與中國科學院保存的中國被毛孢模式菌株 HMAS 55469 為同種。再次顯示自青海、甘肅、四川、西藏等地的冬蟲夏草為同一物種的根據，而其無性世代菌種為中國被毛孢。Chen 等人⁽¹⁴⁾發表以 rRNA 基因 ITS 區間設計的種專一性引子，進行不同地區冬蟲夏草標本的鑑別結果，由此引子擴增的產物顯示地理位置不同的冬蟲夏草具有非常相似的 rRNA 基因 ITS 序列。章等人⁽¹⁵⁾發表自西藏採集的冬蟲夏草子實體中，分離培養出形態特徵和 rRNA 基因 ITS 區間核酸序列與中國被毛孢相同的無性世代菌株。

陳與許⁽¹⁶⁾發表以特定 18S rRNA 基因序列鑑別冬蟲夏草分離菌株的對應關係，結果顯示分離自西藏冬蟲夏草標本的無性世代菌株中，確實存在 18S rRNA 基因序列與冬蟲夏草菌核、子座完全相同的菌株，其生長特性與形態特徵與中國被毛孢相似，但亦可自其中分離出數株序列不同的伴生菌種。此結果可知 18S rRNA 基因序列能有效鑑別冬蟲夏草無性世代菌種的正確性。

有鑑於基因資料庫中可供比對的參考序列以 ITS、5.8S rRNA 基因序列為主，本文將探討已完成 18S rRNA 基因定序的蟲草屬相關研究材料在 ITS、5.8S rRNA 基因組成上的差異性，作為與其它單位蟲草研究成果驗證比對的基礎。

材 料 與 方 法

一、試驗標本及菌株

本試驗所使用的蟲草屬樣品編號及來源如表一所示，自取得後皆保存於 -20℃ 冰箱中。

表一 本試驗所用蟲草屬樣品
Table 1. The *Cordyceps* spp. used in this study

Species	Specimen No.	Tissue used to prepare DNA	Source	Location	Collected date	Accession No.
<i>Cordyceps sinensis</i>	Cs824af	Sclerotium	Sze Chuan, China	A	Oct. 1995	AJ488272
	Cs824b	Sclerotium	Sze Chuan, China	A	Oct. 1995	AJ488267
	W1023f	Stroma	Sze Chuan, China	B	Sep. 1996	AJ488260
	W1023t	Sclerotium (tail)	Sze Chuan, China	B	Sep. 1996	AJ488259
	Cs1014Cb	Sclerotium	Tibet, China	C	May 1997	AJ488268
	Cs7528A1	Sclerotium	Tibet, China	C	May 1997	AJ488252
	Cs7528A2	Stroma	Tibet, China	C	May 1997	AJ488253
	Cs7528Jf	Stroma	-	A	May 1997	AJ488273
	Cs7528Jt	Sclerotium (tail)	-	A	May 1997	AJ488239
	Cs7528Hf	Stroma	-	A	May 1997	AJ488245
	Cs7528Ht	Sclerotium (tail)	-	A	May 1997	AJ488250
	RSCsIf	Stroma	-	A	May 1997	AJ488236
	RSCsIh	Sclerotium (head)	-	A	May 1997	AJ488237
	RSCsIt	Sclerotium (tail)	-	A	May 1997	AJ488238
	RSCsKf	Stroma	-	A	May 1997	AJ488249
	RSCsKh	Sclerotium (head)	-	A	May 1997	AJ488248
	RSCsKt	Sclerotium (tail)	-	A	May 1997	AJ488247
	RSCsLf	Stroma	-	A	May 1997	AJ488240
	RSCsLh	Stroma	-	A	May 1997	AJ488246
	RSCsLt	Sclerotium (tail)	-	A	May 1997	AJ488241
	RSCsMf	Stroma	-	A	May 1997	AJ488242
	RSCsMh	Sclerotium (head)	-	A	May 1997	AJ488243
	RSCsMt	Sclerotium (tail)	-	A	May 1997	AJ488244
	csdf	Sclerotium	-	A	May 1997	AJ488269
	csdb	Sclerotium	-	A	May 1997	AJ488270
	Cs824df	Stroma	-	A	May 1997	AJ488271
	S1023f	Stroma	Tibet, China	A	Oct. 1998	AJ488257
	S1023h	Sclerotium (head)	Tibet, China	A	Oct. 1998	AJ488256
	S1023t	Sclerotium (tail)	Tibet, China	A	Oct. 1998	AJ488258
	T1023f	Stroma	Qinghai, China	A	Oct. 1998	AJ488263
	T1023h	Sclerotium (head)	Qinghai, China	A	Oct. 1998	AJ488261
	T1023t	Sclerotium (tail)	Qinghai, China	A	Oct. 1998	AJ488262
	H1023f	Stroma	Qinghai, China	D	Oct. 1998	AJ488254
	H1023t	Sclerotium (tail)	Qinghai, China	D	Oct. 1998	AJ488255
	K1023f	Stroma	-	A	Oct. 1998	AJ488264
	K1023h	Sclerotium (head)	-	A	Oct. 1998	AJ488265
	K1023t	Sclerotium (tail)	-	A	Oct. 1998	AJ488266
	CsRSbH1	Mycelia	Tibet	E	May. 1997	AJ488273
	RS2	Mycelia	Tibet	E	May. 1997	AJ488275
	RS3	Mycelia	Tibet	E	May. 1997	AJ488274
<i>C. militaris</i>	CMC2	Stroma	China	B	May 1997	AJ488277
<i>C. memorabilis</i>	ATCC 36743	Mycelia	-	CCRC	-	AJ488276

A: Purchased at Chinese drug store in Taipei.

B: Purchased at Chinese drug store in Beijing.

C: Collected in Tibet, China.

D: Purchased at Chinese drug store in Qinghai, China.

E: Isolated from *C. sinensis* specimen.

CCRC: Culture Collection & Research Center, Hsinchu, Taiwan.

ATCC: American Type Culture Collection, USA.



二、菌種培養

供試菌種以 PDB (potato dextrose broth, DIFCO Laboratories Co., Detroit, Michigan, USA) 為培養基，在 26℃、100 rpm 下振盪培養二至四週，菌絲體以濾紙過濾收集並以無菌水清洗兩次，減壓濃縮除去水分後，以液態氮研磨成粉狀，保存於-20℃冰箱中。

三、DNA 萃取

DNA 萃取⁽⁷⁾：取 100 mg 菌絲體加入 600 μL 的 lysis buffer (50 mM Tris-HCl、50 mM EDTA、3% SDS、1% 2-mercaptoethanol，pH 7.2)，以 600 μL PCI (phenol：chloroform：isoamyl alcohol = 25：24：1，Sigma Co., Saint Louis, MO, USA) 去除蛋白質及雜質，取出水層加入 0.1 倍體積 3 M 醋酸鈉溶液及 0.6 倍體積異丙醇沉澱 DNA，沉澱物以 70% 冰酒精清洗數次，待酒精揮發後，加入 100 μL TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA，pH 8.0) 及 0.1 倍體積 RNase (500 μg/mL，Roche Applied Science Co., Mannheim, Germany) 於 37℃ 反應一小時後加入 100 μL 氯仿分層，取出水層後加入 0.1 倍體積 3 M 醋酸鈉及 0.6 倍體積異丙醇再次沉澱 DNA，沉澱的 DNA 以 100 μL 無菌水溶解，保存於-20℃下。每 100 mg 樣品粉末可萃取得 1 μg DNA。

四、聚合酶連鎖反應 (PCR, polymerase chain reaction)

本試驗中聚合酶連鎖反應使用引子的序列如表二所示⁽¹⁷⁾。PCR 反應條件參照陳和許⁽⁷⁾的方法。PCR 反應步驟為：起始變性溫度 98℃、二分鐘；變性溫度 95℃、45 秒，接合溫度 52℃、45 秒，延展溫度 72℃、二分鐘，循環 35 週期；最後延展溫度 72℃、十分鐘。反應產物取 5 μL，以 1.2% (w/v) agarose gel、100 V 電壓於 0.5 倍 TAE 溶液 (0.02 M Tris base，0.02 M acetate, and 0.0005 M EDTA, AMRESCO Co, Solon, OH, USA) 中電泳約 25 分鐘，再以 ethidium bromide (0.05 μL/mL) 染色 20 分鐘，於紫外燈下觀察結果。

五、核酸定序

以 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 純化、回收聚合酶連鎖反應產

表二 試驗所使用之引子¹
Table 2. List of primers used in this study

Primer designation	Primer sequences (5' 3')
NS 3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC
NS 6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS 2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS 3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS 5	GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG

1 引子係引用參考文獻⁽¹⁷⁾

物，並選殖入 pGEM-T 載體 (Promega Co., Madison, USA)，利用自動定序儀 (Applied Biosystems 373 DNA Sequencer, Perkin-Elmer Life Sciences Co., Shelton, USA) 進行核酸定序。

六、ITS、5.8S rRNA 基因序列的比較與分析

將供試樣品 rRNA 基因 ITS 1、5.8S、ITS 2 區域序列利用電腦套裝軟體 BioEdit 進行核酸序列排序分析，以電腦套裝軟體 PAUP 4.0 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony 4.0, Sinauer Associates, Inc. Publishers) 進行演化樹計算，以套裝軟體 Tree View 3.0 (Diving of Environmental and Evolutionary Biology IBLS) 建立演化樹。

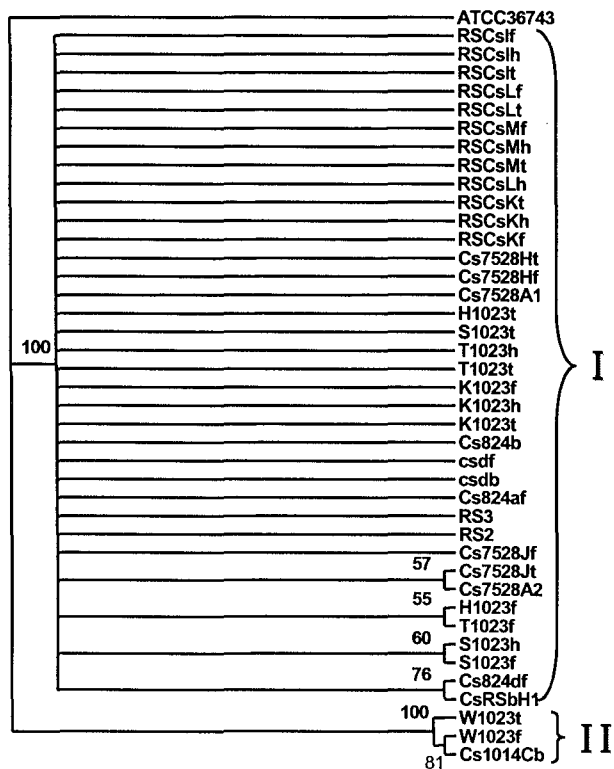
結果與討論

一、rRNA 基因 ITS 1、5.8S、ITS 2 區域定序結果

冬蟲夏草標本、冬蟲夏草菌種、蟲草屬菌種標本及蟲草屬菌種經 rRNA 基因 ITS 1、5.8S、ITS 2 區域定序後，自 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 基因資料庫所取得的登錄號碼分別如表一所示。

二、冬蟲夏草 rRNA 基因 ITS 1、5.8S、ITS2 區域序列分析

冬蟲夏草樣品經 18S rRNA 基因序列 NS3/NS6 區域鑑定後，再進行 rRNA 基因 ITS 1、5.8S、ITS2 區域序列分析及親緣關係計算，結果如圖一所示。以 *C. memorabilis* ATCC 36743 為外群 (out group) 時，冬蟲夏草樣品可以分為兩群，第 I



圖一 本研究之冬蟲夏草樣品以 ITS 區域 rRNA 基因序列當作冬蟲夏草分類指標進行 PAUP 統計分析所得的系統演化關係圖

Fig. 1. Phylogenetic relationships of *C. sinensis* in this study inferred from nucleotide sequences of rRNA gene ITS region.

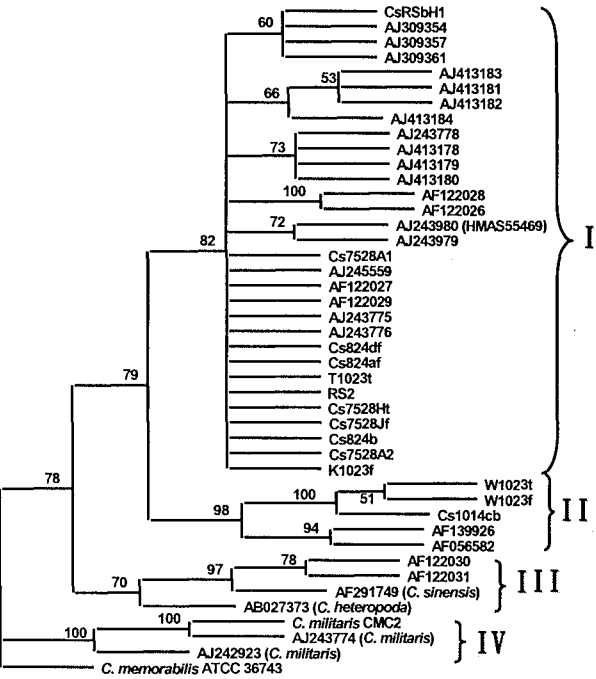
群為：*C. sinensis* 樣品 RSCsIf、RSCsIh、RSCsIt、RSCsLf、RSCsLh、RSCsLt、RSCsMf、RSCsMh、RSCsMt、RSCsKf、RSCsKh、RSCsKt、Cs7528Hf、Cs7528Ht、Cs7528A1、Cs7528A2、H1023f、H1023t、S1023f、S1023h、S1023t、T1023f、T1023h、T1023t、K1023f、K1023h、K1023t、Cs824b、csdf、csdb、Cs824af、Cs7528Jf、Cs7528Jt、Cs824df、RS2、RS3、CsRSbH1，序列與冬蟲夏草無性世代 *H. sinensis* (HMAS 55469) ITS 區序列相同度(identity)達 98.9%以上，而第 I 群供試樣品間彼此的序列相同度達 99.6%以上；第 II 群為：*C. sinensis* Cs1014cb、W1023f、W1023t，序列與 *H. sinensis* (HMAS55469) ITS 區序列相同度僅為 61.8%，而第 II 群供試樣品間彼此的序列相同度為 82.4-100%。

第 I 群中，1995 年四川採集的冬蟲夏草標本 Cs824 其子座 Cs824af 及菌核 Cs824ab 在引子組 ITS1/ITS4 間具有完全相同的核酸序列，1997 年西藏採集的冬蟲夏草標本 Cs7528A 其子座 Cs7528A2 及菌核 Cs7528A1 在引子組 ITS1/ITS4 間亦具有完全相同的核酸序列；第 II 群中，四川採集的冬蟲夏草標本 W1023 其子座 W1023f 及菌核 W1023b 在引子組 ITS1/ITS4 間也具有完全

相同的核酸序列。此結果與陳和許⁽¹⁶⁾ 18S rRNA 基因 NS3/NS6 區域之研究結果相符，再次顯示冬蟲夏草的子座與菌核具有相同的基因組成。Kinjo 和 Zang⁽¹³⁾ 發表採集自中國西南山區 11 個冬蟲夏草樣品其 rRNA 基因之 ITS1、2 和 5.8S 區間核酸序列顯示為相同群聚的基因組成，作者認為應是相同物種，而其中又可分為兩個亞群，其第一群的序列與本研究第 I 群相符，但其第二群序列並未正式發表，其序列是否與本研究第 II 群序列相符則仍需進一步了解。

三、冬蟲夏草標本 rRNA 基因 ITS 1、5.8S、ITS 2 區域序列與基因資料庫核酸序列的比對

將供試樣品 rRNA 基因 ITS 1、5.8S、ITS 2 區域序列與基因資料庫核酸收錄的序列(表三)進行比對分析與親緣關係計算(圖二)，結果顯示以 *C. memorabilis* ATCC 36743 (Acc. No. AJ488276) 為外群時，所有序列可分為四群。第 IV 群的蛹蟲草 *C. militaris* 序列 AJ242923、AJ243774 及本試驗樣品 *C. militaris* CMC2 序列 AJ488277 首先被區分出來；接著被區分出來的為第 III 群的 *C.*



圖二 本研究使用之冬蟲夏草樣品與基因資料庫已發表之 ITS 區域序列當作冬蟲夏草分類指標進行 PAUP 統計分析所得的系統演化關係圖

Fig. 2. Phylogenetic relationships of *C. sinensis* in this study and sequences from EMBL databank inferred from nucleotide sequences of rRNA gene ITS region.

表三 EMBL 基因資料庫中所引用的序列
Table 3. The sequences from EMBL databank used in this study

Species	Specimen or strain	Tissue	Location	Collector/Author	Accession No.
<i>Cordyceps sinensis</i>	Specimen L95D03(BM)	-	Beima Snow Mountain, Yunnan, China	Z. Y. Liu <i>et al.</i>	AJ309361
	Specimen L95D04(RZ)	-	Renzhi Snow Mountain, Yunnan, China	Z. Y. Liu <i>et al.</i>	AJ309354
	Specimen L95D05(5137)	-	Beima Snow Mountain, Yunnan, China	Z. Y. Liu <i>et al.</i>	AJ309355
	-	-	-	S. C. Chou and L. W. Li	AF122026
	-	-	-	S. C. Chou and L. W. Li	AF122027
	-	-	-	S. C. Chou and L. W. Li	AF122028
	-	-	-	S. C. Chou and L. W. Li	AF122029
	Strain CCRC 36421	Mycelia	-	S. C. Chou and L. W. Li	AF122030
	Strain CCRC 36421	Mycelia	-	S. C. Chou and L. W. Li	AF122031
	-	-	-	J.C. Kang	AF139926
	-	-	-	J.C. Kang	AF056582
	Strain MPNU 8002	Mycelia	-	J. E. Park <i>et al.</i>	AF291749
	Strain WNS03	Mycelia	Sichuan province, China	Y. Q. Chen <i>et al.</i>	AJ413183
	Strain LCY9902	Mycelia	Qinghai provice, China	Y. Q. Chen <i>et al.</i>	AJ413181
	Strain LCY9902	Mycelia	Qinghai provice, China	Y. Q. Chen <i>et al.</i>	AJ413182
	Strain WNS04	Mycelia	Sichuan province, China	Y. Q. Chen <i>et al.</i>	AJ413184
	-	-	Tibet, China	Y. Q. Chen <i>et al.</i>	AJ413178
	-	-	Tibet, China	Y. Q. Chen <i>et al.</i>	AJ413179
	Strain LiT9807	Mycelia	Tibet, China	Y. Q. Chen <i>et al.</i>	AJ413180
	-	Stroma	Tibet, China	J. Zhao <i>et al.</i>	AJ243778
	-	Sclerotium	Tibet, China	J. Zhao <i>et al.</i>	AJ243775
	-	Ascospore	Tibet, China	J. Zhao <i>et al.</i>	AJ243776
	Strain LiT9704	Mycelia	Tibet, China	J. Zhao <i>et al.</i>	AJ245559
<i>C. heteropoda</i>	-	-	-	N. Nikoh and T. Fukatsu	AB027373
<i>C. militaris</i>	-	-	Guangdong, China	Q. Y. Chen <i>et al.</i>	AJ242923
	Strain N1	Mycelia	Beijing, China	J. Zhao <i>et al.</i>	AJ243774
<i>Hirsutella sinensis</i>	Strain Zhw01	Mycelia	Guangdong, China	J. Zhao <i>et al.</i>	AJ243979
	Strain HMAS 55469	Mycelia	Beijing, China	J. Zhao <i>et al.</i>	AJ243980

heteropoda 序列 AB027373、*C. sinensis* MPNU 8002 序列 AF291749、*C. sinensis* CCRC 36421 序列 AF122031、*C. sinensis* CCRC 36421 序列 AF122030，惟菌種 *C. sinensis* CCRC 36421 經 18S rRNA 基因序列鑑定並非冬蟲夏草^(7,16)，故第 III 群菌種雖以 *C. sinensis* 命名但不列入冬蟲夏草探討。

將冬蟲夏草樣品與基因資料庫收錄的 rRNA 基因 ITS 1、5.8S、ITS 2 區域序列進行親緣關係計算，所得親緣分群圖亦可將冬蟲夏草分為兩群，第 I 群包含基因資料庫收錄的冬蟲夏草序

列：AJ309354、AJ309357、AJ309361、AJ413183、AJ413181、AJ413182、AJ413184、AJ243788、AJ413178、AJ413179、AJ413180、AF122028、AF122026、AJ243979、AJ245559、AF122027、AF122029、AJ243775、AJ243776 及 AJ243980（冬蟲夏草無性世代菌種 *H. sinensis* HMAS55469）；第 II 群包含基因資料庫收錄的冬蟲夏草序列：AF139926、AF056582。

Chen 等人⁽¹¹⁾認為 ITS 1、5.8S、ITS 2 區域序列能鑑別冬蟲夏草，並設計引子組 (probe 1/

probe 2)作為探針，認為能被引子組成功擴增的即為冬蟲夏草，惟參照本研究結果發現，引子組僅能擴增的第 I 群的冬蟲夏草，第 II 群則無法被成功擴增，故此探針只能鑑定屬於第 I 群的冬蟲夏草樣品。第 I 群及第 II 群冬蟲夏草在 18S rRNA 基因 NS3/NS6 區域之核酸序列完全相同，且具有冬蟲夏草專一的兩個 *Cfo* I、兩個 *Rsa* I 限制酶切位⁽¹⁶⁾，但兩群間在 ITS 1、5.8S、ITS 2 區域則相似度僅約 62.3%，故我們認為冬蟲夏草分子生物鑑定系統應以 18S rRNA 基因 NS3/NS6 區域序列作為菌種鑑定的指標，而 ITS 1、5.8S、ITS 2 區域序列則可作為品種鑑別依據。

參 考 文 獻

- (1) 許瑞祥：人工培養冬蟲夏草屬之性質及其代謝物之探討。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文，台北，台灣 (1984)。
- (2) 清水大典：原色冬蟲夏草圖鑑。誠文堂新光社，東京，日本 (1994)。
- (3) 趙書慶：利用核糖體 DNA 的內轉錄區鑑定蟲草屬真菌。台北醫學院細胞及分子生物研究所碩士論文，台北，台灣 (1998)。
- (4) 應建浙、卯曉嵐、馬啟明、宗毓臣、文華安：中國藥用真菌圖鑑。科學出版社，北京，中國 (1987)。
- (5) 許瑞祥、陳志昇、凌啟鴻：冬蟲夏草(*Cordyceps sinensis*)無性世代菌種之確認。生物產業，13: 474-480 (2002)。
- (6) 梁宗琦：蟲草及其無性型的生物多樣性。真菌學報，12: 51-57 (1997)。
- (7) 陳志昇、許瑞祥：利用 18S 核糖體基因限制酶水解多型性圖譜鑑別冬蟲夏草標本之研究。中國農業化學會誌，37: 533-545 (1999)。
- (8) R. A. Jorgensen and P. D. Cluster: Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: New characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Ann. Missouri Botanical Garden*, 75: 1238-1247 (1989).
- (9) 趙錦、王寧、陳月琴、李泰輝、屈良鵠：冬蟲夏草無性型的分子鑑定。中山大學學報，38: 121-123 (1999)。
- (10) 李增智、黃勃、李春如、樊美珍：確認冬蟲夏草之間的關係。菌物系統，19: 60-64 (2000)。
- (11) Y. Q. Chen, N. Wang, L. H. Qu, T. H. Li. and W. M. Zhang: Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S rDNA. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29: 597-607 (2001).
- (12) Z. Y. Liu, Y. J. Yao, Z. Q. Liang, A. Y. Liu, D. N. Pegler and M. W. Chase: Molecular evidence for the anamorph-teleomorph connection in *Cordyceps sinensis*. *Mycol. Res.*, 105: 827-832 (2001).
- (13) N. Kinjo and M. Zang: Morphological and phylogenetic studies on *Cordyceps sinensis* distributed in southwestern China. *Mycoscience*, 42: 567-574 (2001).
- (14) Y. Q. Chen, N. Wang, H. Zhou and L. H. Qu: Differentiation of medicinal *Cordyceps sinensis* by rDNA ITS sequence analysis. *Planta Med.*, 68: 635-639 (2002).
- (15) 章衛民、李泰輝、陳月琴、屈良鵠、鍾韓、徐學平：西藏冬蟲夏草無性型的分子生物學研究。微生物學報，29: 54-58 (2002)。
- (16) 陳志昇、許瑞祥：利用 18S rRNA 基因序列鑑別冬蟲夏草之研究。台灣農業化學與食品科學，40: 219-225 (2002)。
- (17) T. J. White, T. Bruns, S. Lee and J. Taylor: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols* (Innis, M. A., Gelfand, D. H. Sninsky, J. J. and White, T. J. eds.), pp. 315-322. Academic Press, Inc., New York, USA (1990).

