

冬虫夏草菌染色体数量的初步研究*

孟国良^{1,2**} 杜卓^{1**} 张晓兰³ 杨瑞恒⁴ 王永会^{1,2} 陆焦焦⁵
余丹⁵ 董彩虹¹ 姚一建¹ 李熠^{5***}

(1. 中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101; 4. 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403; 5. 扬州大学食品科学与工程学院, 扬州 225127)

摘要 【目的】冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 是一种重要的食药两用真菌, 仅分布在青藏高原及其周边高海拔地区, 具有独特的生存环境、生物学特性以及显著扩张的基因组。本研究旨在确定冬虫夏草菌的染色体数量, 为该物种的基因组测序、进化、遗传和分子生物学研究奠定基础, 也为其他虫草菌染色体计数研究提供参考。【方法】二、三代测序辅以 Hi-C 组装, 结合显微观察研究冬虫夏草的染色体数量。选择已组装获得基因组完成图的冬虫夏草 1229 菌株, 首先利用昆虫细胞培养液培养获得芽生孢子, 芽生孢子经秋水仙素和溶壁酶处理, 获得细胞有丝分裂中期分散的染色体, DAPI 荧光染色后使用激光共聚焦显微镜观察计数, 结合基因组组装和显微观察的结果确定冬虫夏草染色体数量。【结果】二、三代测序辅以 Hi-C 组装, 得到 6 条包含两端端粒的完整染色体, 染色体之间显示出较强的端粒互作; 显微观察结果也支持冬虫夏草 1229 菌株的染色体数量为 6 条。【结论】冬虫夏草菌的基因组包含 6 条染色体, 芽生孢子是观察冬虫夏草菌染色体的理想材料。

关键词 真菌; 基因组组装; 芽生孢子; 染色体计数; Hi-C

A preliminary study of chromosome number in *Ophiocordyceps sinensis*

MENG Guo-Liang^{1,2**} DU Zhuo^{1**} ZHANG Xiao-Lan¹ YANG Rui-Heng³ WANG Yong-Hui^{1,2}
LU Jiao-Jiao⁴ YU Dan⁴ DONG Cai-Hong¹ YAO Yi-Jian¹ LI Yi^{4***}

(1. State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences,

Beijing 100101, China; 4. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China;

5. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the chromosome number of *Ophiocordyceps sinensis*, an important edible and medicinal fungi endemic to Tibetan Plateau and surrounding areas of high elevation, and thereby lay a foundation for genome sequencing and other research on the evolution, genetics and molecular biology of this species, as well as help determine the chromosome number of other entomogenous fungi. 【Methods】A genome assembly using second and third generation sequencing technology supplemented with Hi-C data, in addition to microscopic observation, was used to determine the chromosome number of *O. sinensis*. Strain 1229, the genome of which has been sequenced and assembled to a complete level, was cultured in insect cell culture medium to acquire blastospores. Blastospores were co-incubated with colchicines, then treated with lywallzyme to obtain dispersed metaphase chromosomes. Those chromosomes were stained with fluorescent DAPI, then observed and counted under a laser confocal microscope. 【Results】Based on the genome assembly obtained from second and third generation sequencing and Hi-C data, strain 1229 of *O. sinensis* was found to possess six chromosomes with a strong telomere interaction between chromosomes. This number was supported by microscopic observations. 【Conclusion】The genome of *O. sinensis* possesses six chromosomes. Blastospores are suitable for counting the chromosomes of *O. sinensis*.

Key words fungi; genome assembly; blastospore; chromosome counting; Hi-C

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (32170001)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 18706387822@163.com; duz@im.ac.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liyi062@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-07-02; 接受日期 Accepted: 2021-08-23

染色体数量是生物最基本的遗传特性, 染色体计数是细胞遗传学研究的重要内容, 在进化生物学研究中有重要意义。动植物基因组较大, 常规光学显微镜即可观察到染色体, 方法较为成熟, 大多数动植物的染色体数量都已明确(陈宜峰和郭健民, 1984; 陈瑞阳等, 1989)。真菌基因组远小于动植物, 染色体很难用普通光学显微镜观察, 绝大多数真菌物种的染色体数量还未确定(Wieloch, 2006)。

真菌染色体计数方法按原理大致可分为 4 类, 遗传连锁图法(Genetic linkage map)、显微观察法、脉冲场凝胶电泳法(Pulse field gel electrophoresis, PFGE)以及 Hi-C 法(High-throughput chromosome conformation capture)(李波等, 2021)。遗传连锁图法通过计算不同基因或分子标记之间的相对距离构建连锁群, 在基因或分子标记数量足够的情况下, 连锁群数量可反映染色体的数量(杜庆章, 2014)。遗传连锁图法虽然结果较为可靠, 但构建遗传连锁图特别是真菌的遗传连锁图操作极为繁琐, 除脉孢霉属 *Neurospora* 和曲霉属 *Aspergillus* 少数物种以及部分栽培食用菌外(Barry, 1996; 刘伟等, 2010; O'Connell *et al.*, 2012), 绝大多数物种未构建遗传连锁图。

显微观察法使用传统光学显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、扫描电镜等对有丝分裂或减数分裂中期细胞的染色体进行染色观察, 可直观获得染色体的数目(Iwano *et al.*, 1997; Tsuchiya *et al.*, 2004; Wanner and Schroederreiter, 2008)。诺贝尔奖得主 McClintock (1945) 通过染色体的显微观察, 揭示了模式物种粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa* 减数分裂的全过程。然而, 真菌染色体的大小处于光学显微镜的分辨力极限边缘, 且相对聚集, 通常很难清楚区分所有染色体, 且最终效果受染色剂种类、染色时间及操作技巧等各种因素的影响, 有时需通过多次观察收集大量数据取平均值来减少误差(Poma *et al.*, 1998; 郭冰峰, 2014)。Shirane 等(1989)创立的芽管爆裂法(Germ tube burst method)能将有丝分裂中期的染色体更好地分散在载玻片上, 有

利于观察计数, 在真菌中应用较为广泛(Taga and Murata, 1994; Dai and Taga, 2001; 郭冰峰, 2014; Pires *et al.*, 2016; 张欣, 2019)。此外, 利用溶壁酶处理后得到原生质体再进行固定和染色观察效果可能更佳(Poma *et al.*, 1998)。

PFGE 法也是真菌染色体计数的常用方法。Schwartz 和 Cantor (1984) 首次将其用于酵母染色体分离, 此后, 又有多种改进的基于电泳的染色体分型方法出现(Beadle *et al.*, 2003)。PFGE 法无需制备分裂中期的细胞, 但需要获得完整的基因组 DNA, 可分离的染色体一般在 10-10 000 kb 的大小范围, 大小相近的染色体很难区分(Beadle *et al.*, 2003; 李波等, 2021), 而且不太适用于基因组较大的物种。

Hi-C 是一种染色体构象捕获技术, 可获得 DNA 序列在基因组上的位置信息, 与三代测序结合可组装出染色体水平甚至完成图水平的真菌基因组。除极少数基因组较大(>120 Mb)的物种外, 足够数据量的二、三代测序辅以 Hi-C 组装, 可获得大多数真菌基因组的完成图, 因此也可以确定染色体数量。Hi-C 法目前成本较高, 且结果可能受组装算法的影响, 有一定的主观性, 需要用其他方法进行验证。

冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 是一种重要的珍稀食药真菌, 由于其良好的药用价值, 受到全世界的关注(Holliday and Cleaver, 2008)。近年来受过度采挖和气候变化的影响, 资源不断萎缩(Yan *et al.*, 2017), 中国大型真菌红色名录评估其为易危物种(姚一建等, 2020)。国内已有多个研究团队对其基因组进行了测序、组装和解析(Hu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020; Shu *et al.*, 2020), 但由于存在大量重复序列, 基因组显著扩张, 其基因组大小(~110 Mb)是普通丝状真菌(30-40 Mb)的 3 倍以上, 即使采用三代测序, 也很难组装出染色体水平的基因组序列(Liu *et al.*, 2020; Shu *et al.*, 2020)。目前获得的最完整的冬虫夏草菌基因组包含 23 个重叠群(contig)(Shu *et al.*, 2020), 接近染色体水平, 但还不是完成图, 无法确定染色体数量。

本研究在二、三代测序组装的基础上,辅助 Hi-C 数据,最终组装出 6 条包含两端端粒的完整染色体。考虑到组装过程中可能存在的主观人为因素,以芽生孢子为材料,对冬虫夏草菌的染色体进行了显微观察计数,验证组装结果并确定染色体数量,为冬虫夏草菌遗传学的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

基因组测序及显微观察所用的 1229 菌株通过单子囊孢子分离获得,分离所用的新鲜成熟标本于 2005 年 6 月 21 日采集自青海省果洛州玛沁县雪山乡,本实验室保存标本号 CS68。单孢分离方法参照焦磊(2010)。

1.2 基因组测序及组装

基因组 DNA 提取使用液体培养的菌丝体,冷冻干燥后送至测序公司进行二、三代和 Hi-C 测序。二代测序在武汉未来组生物科技有限公司完成,提取的基因组 DNA 先构建 500 bp DNA 文库,采用 100 bp 双末端测序,测序平台为 Illumina HiSeq 2500 (Li *et al.*, 2016)。三代测序 (PacBio) 在天津生物芯片技术有限责任公司完成,基因组 DNA 提取使用 TIANamp Yeast DNA 试剂盒 (TIANGEN Biotech (Beijing) Co., Ltd., 中国),操作方法按厂家说明。基因组 DNA 先用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,再用 Qubit2.0® Fluorometer (Life Technologies, 美国) 检测浓度和质量;构建 20 kb 文库,在 PacBio RS II 测序平台使用 C4P6 试剂测 19 个 SMRT cells。Hi-C 测序在上海凌恩生物科技有限公司完成,文库构建使用 Dovetail™ Hi-C 试剂盒 (Dovetail Genomics, 美国),染色体先用甲醛溶液固定,再用 *Mbo* I 酶切产生粘末端,粘末端用生物素标记后补齐环化。环化后的 DNA 经蛋白酶酶解后纯化打断成~450 bp,用 Streptavidin Beads 回收生物素标记的 DNA,PCR 扩增后构建双末端测序文库,在 Illumina HiSeq 4000 平台测序,读长 150 bp。

二代测序数据先用 FastQC 软件 (Andrews, 2010) 进行质控分析,然后用 Trimmomatic v0.39 软件 (Bolger *et al.*, 2014) 去除接头和低质量序列得到 clean data。三代测序原始数据先去除接头序列和低质量碱基,然后用 Canu v2.2 (<https://github.com/marbl/canu/releases>) 进行初步校准和组装,组装出的 contigs 用 Racon v1.4.3 (Vaser *et al.*, 2017) 在默认参数下用 PacBio 测序数据进行校准,校准过程重复 3 次,校准过的 contigs 用二代测序数据使用 Pilon v1.22 软件 (Walker *et al.*, 2014) 再校准 3 次。Hi-C 测序数据经过与以上二代测序同样的流程后,用 BWA v0.7.15 软件 (Li and Durbin, 2009) 与上述组装结果进行比对,再经过 HiC-Pro v2.7.8 (Servant *et al.*, 2015)、3D de novo assembly (Dudchenko *et al.*, 2018)、ALLHiC (Zhang *et al.*, 2019) 等分析流程将校正过的 contigs 进行聚类、排序和定向,得到最终的组装结果。

1.3 芽生孢子制备及染色前处理

冬虫夏草菌芽生孢子 (Blastospore) 制备过程如下:每升含 10% 胎牛血清 (赛默飞,北京) 的 Grace's Antheraea 培养液 (Life Technologies Corporation, 美国) 中加入 3.3 g 酵母粉和 3.3 g 乳白蛋白水解物,用 1 mol·L⁻¹ KOH 调 pH 至 6.2-6.4,过滤除菌,4 °C 保存备用。在以上培养液中接种草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢细胞 Sf9 (鼎国昌盛,北京) 贴壁培养;以多次传代培养后的 Sf9 细胞培养液作为培养基,将 1229 菌种接种至培养液中,18 °C 静置培养 20 d,显微镜下观察到大量芽生孢子时,过滤去掉菌丝,保留芽生孢子液备用。

1.4 染色体染色及观察计数

芽生孢子液中加入 0.5% 秋水仙素 (Biological Industries, 以色列),18 °C、120 r·min⁻¹ 振荡培养 48-72 h,镜检观察到有芽生孢子长出后收集细胞到 EP 管中,加入 1 mL 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered solution, PBS) 漂洗 3 次,弃上清。加入 2% 溶壁酶 (广东省科学院微生物研究所) 处理 30 min,离心弃上清,

加入 500 μ L PBS 缓冲液。DAPI (Gen-View, El Monte, CA, 美国) 染色 10 min, 用激光共聚焦显微镜 (Leica sp8, 德国) 在 63 $\times$ 物镜下观察有丝分裂中期的细胞。拍照并测量染色体的长度、荧光面积等。

1.5 中心粒染色体定位

中心粒在染色体上的位置信息有助于染色体的判别和计数, 甚至可以用于识别不同的染色体。DAPI 荧光染色中染色较浅的区域一般为中心粒, 从 Hi-C 基因组组装热图中也可得到较为可靠的中心粒定位信息 (Varoquaux *et al.*, 2015)。中心粒的染色体定位信息依据以上两方面证据大致确定。

2 结果与分析

2.1 基因组组装

经过二、三代测序并辅以 Hi-C 组装, 冬虫夏草菌基因组组装成 6 条完整的染色体, 每条染色体均包含两端端粒序列, 达到完成图水平。其基因组总大小为 111.9 Mb, 6 条染色体长度分别为 Chr I 25.5 Mb、Chr II 22.8 Mb、Chr III 19.8 Mb、Chr IV 17.8 Mb、Chr V 14.3 Mb、Chr VI 11.8 Mb。染色体显示出较强的端粒互作 (图 1), 表明冬虫夏草菌的染色体在细胞核内高度聚集。根据 Hi-C 热图可计算出 6 条染色体中心粒的大致位置为: Chr I ($13.00/25.50 = 0.51$)、Chr II ($11.00/22.80 = 0.48$)、Chr III ($8.00/19.80 = 0.40$)、Chr IV ($7.00/17.80 = 0.39$)、Chr V ($5.30/14.30 = 0.37$) 和 Chr VI ($2.00/11.80 = 0.17$)。

2.2 染色体观察与计数

利用激光共聚焦显微镜, 观察了大量 (>50 个) 芽生孢子有丝分裂中期的细胞, 并拍摄了照片, 最终挑选出 3 张荧光染色清晰, 染色体界限相对明确的照片, 其中 2 张处于有丝分裂前中期 (图 2: A, B), 1 张为有丝分裂中后期 (图 2: C)。结果显示冬虫夏草菌 1229 菌株有 6 条染色体, 其中有 4 条 (Chr I -Chr IV) 可观察到中心粒,

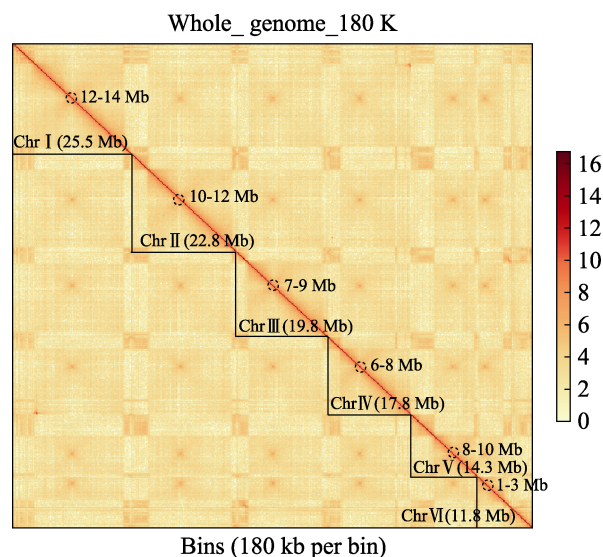


图 1 冬虫夏草菌高通量染色体构象捕获 Hi-C 组装热图

Fig. 1 High-through chromosome conformation capture (Hi-C) heat map of genome assembly of *Ophiocordyceps sinensis*

图中染色体两端颜色较深的长方形方框区域代表端粒互作, 虚线的圆圈表示中心粒的位置。

The darker rectangular areas on both ends of the chromosomes represent interactions of telomeres, and the dotted circles indicate centromeres.

染色体的空间构象有明显差异 (图 2)。Chr I 为哑铃型结构, 中心粒两侧基本等长; Chr II 中心粒两侧部分平行, 表明端粒序列可能较长, 两端 DNA 长度略有差异, Chr III 在 3 个细胞中的形态存在一定的差异, 可能是拍摄角度不同所致, 中心粒两侧 DNA 长度有明显差异; Chr IV 近短杆状, 部分细胞观察到较为明显的中心粒 (图 2: B, C), 有的中心粒不明显 (图 2: A), 可能是细胞处于不同分裂时期所致; Chr V、Chr VI 为卵圆形, 中心粒不明显。

通过测量有明显中心粒的两端染色区域的长度, 得到 4 条染色体中心粒的大致位置在 0.44-0.49 之间 (表 1): Chr I (0.45)、Chr II (0.44)、Chr III (0.49)、Chr IV (0.48), 与 Hi-C 热图给出的结果存在一定的差异。通过测量每条染色体的荧光面积, 得出 Chr I、Chr II、Chr III、Chr IV、Chr V、Chr VI 6 条染色体的面积分别为 2.00、1.86、1.74、1.26、1.06 和 0.78 μm^2 , 大小比例为: Chr I : Chr II : Chr III : Chr IV : Chr V : Chr VI = 2.56 : 2.38 : 2.23 : 1.62 : 1.36 : 1.0 (表 1)。

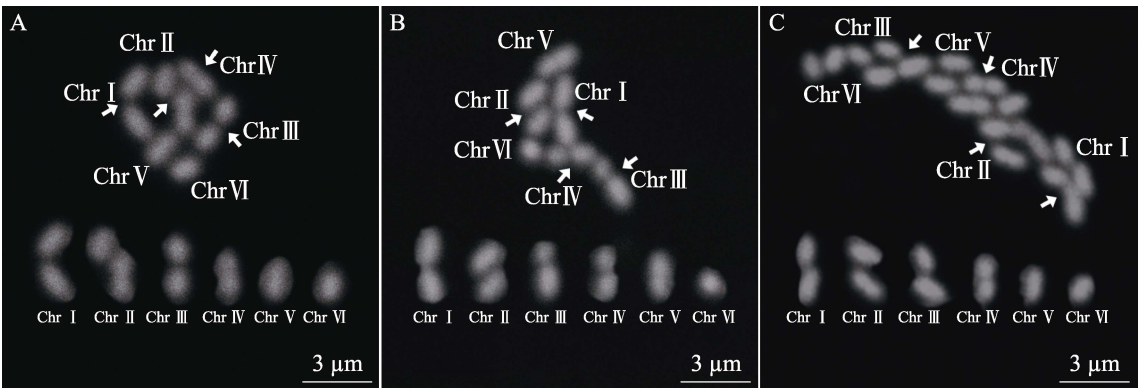


图 2 激光共聚焦显微观察荧光染色的冬虫夏草菌染色体

Fig. 2 Fluorescence staining of chromosomes of *Ophiocordyceps sinensis* observed by laser confocal microscope

A. 有丝分裂前中期; B. 有丝分裂前中期; C. 有丝分裂中后期。

A. Cells of prometaphase; B. Cells of prometaphase; C. Cells of metaphase and anaphase of mitosis.

表 1 冬虫夏草菌 6 条染色体中心粒位置及大小估算

Table 1 Localization of centromeres and estimation of chromosomal sizes of *Ophiocordyceps sinensis*

染色体名称 Chromosome name	中心粒位置 Localization of centromeres				荧光面积 (μm ²) Area of fluorescence			
	A	B	C	平均值 Average	A	B	C	平均值 Average
Chr I	0.46	0.48	0.42	0.45	2.00	1.99	1.99	2.00
Chr II	0.41	0.52	0.39	0.44	1.74	1.88	1.95	1.86
Chr III	0.49	0.54	0.45	0.49	1.68	1.66	1.87	1.74
Chr IV	0.51	0.46	0.46	0.48	1.19	1.28	1.31	1.26
Chr V	—	—	—	—	1.08	1.10	1.00	1.06
Chr VI	—	—	—	—	0.87	0.65	0.81	0.78

中心粒位置通过测量中心粒两侧荧光区域最远距离再计算长度比例得出。—表示中心粒不明显。A、B、C 分别代表图 2 中冬虫夏草菌的不同有丝分裂时期。

The location of centromere is obtained by measuring the longest distance between the fluorescent area on both sides of the centromere and then calculating the length ratio. — indicates that there is no obvious centromere observed. A, B, C indicate different mitotic stages of *Ophiocordyceps sinensis* in Fig. 2.

3 讨论

作为遗传信息的主要载体,染色体的数目和形态结构不仅具有种的特异性,还能反应物种的进化历史(陈宜峰和郭健民,1984)。因此,染色体数目研究不仅是遗传学研究的基础,在分类和系统发育研究中也有重要意义。早期真菌染色体计数多采用显微观察和脉冲场电泳。Borbye等(1992)通过光学显微镜观察到小麦白粉菌 *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* 有 7-8 条染色体;Poma 等(1998)通过显微观察发现夏块菌 *Tuber*

aestivum 有 5-6 条染色体;通过荧光染色观察,郝小花等(2014)报道灰花纹鹅膏菌 *Amanita fuliginea* 染色体数目为 10 条。广义虫草类真菌 *Cordyceps* s.l.的染色体数目也有一些报道,如时连根(2000)用 PFGE 法测得 3 株绿僵菌大孢变种 *Metarhizium anisopliae* var. *majus* 染色体至少为 7 条;汪小艳等(2010)采用等高锁状均质电场凝胶电泳技术,确定 3 株不同的蛹虫草菌株 *Cordyceps militaris* 染色体均为 7 条;荣跃文等(2010)采用钳位均匀电场脉冲电泳系统,发现细脚拟青霉 *Paecilomyces tenuipes* 染色体组被分

离成 8 条带。本研究采用 Hi-C 辅助的二、三代基因组测序和组装以及荧光显微观察, 确定冬虫夏草菌 1229 菌株的染色体数目为 6 条, 与目前已知的广义虫草类真菌染色体数目大体相近。

冬虫夏草菌基因组由于含有较多的长末端重复反转录转座子序列 (Long terminal repeat retrotransposons), 常规的二、三代测序均无法组装出完整的基因组 (Hu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020; Shu *et al.*, 2020)。通过补充 Hi-C 测序数据, 冬虫夏草菌基因组被组装成 6 条完整的染色体, 基因组大小 111.9 Mb, 是目前 GenBank 上保存的第二大子囊菌基因组, 也是已知广义虫草中基因组最大的物种 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/eukaryotes/>)。Hi-C 辅助二、三代测序组装有望获得包括广义虫草在内的绝大多数真菌物种的全基因组序列, 是目前最有效的基因组测序策略。

本研究采用秋水仙素处理芽生孢子, 获得大量有丝分裂中期的细胞, 再经过溶壁酶消化细胞壁制备原生质体, 固定染色后用激光共聚焦显微镜进行观察。芽生孢子的优势是可在实验室快速大量培养获得, 更容易制备原生质体, 且芽生孢子在昆虫培养液中可不断分裂而不形成菌丝, 保持单核状态。冬虫夏草菌菌丝不仅生长缓慢, 原生质体制备困难, 且会形成双核或多核体 (胡晓棣等, 2016), 影响后续观察计数。分生孢子和子囊孢子则难以大量获得且会萌发形成菌丝体。冬虫夏草菌的子囊孢子通常有很多分隔 (刘作易等, 2003), 不易制备出包含单个细胞核的原生质体。芽生孢子是真菌通过菌丝出芽形成的无性孢子, 一般在营养成分丰富的液体培养条件下产生 (宋文婧等, 2011), 虫生真菌的芽生孢子在寄主侵染过程中发挥着重要作用。冬虫夏草菌的研究表明, 芽生孢子是真菌侵染寄主昆虫后, 在血腔中的主要存在形式, 侵染后长达 5 个月时间内, 芽生孢子在血腔大量分裂繁殖而不杀死寄主 (Li *et al.*, 2020)。

从 Hi-C 基因组组装热图可以看出, 冬虫夏草菌染色体存在较强的端粒互作 (图 1), 意味

着冬虫夏草菌的染色体在细胞核内较为聚集, 这与显微观察的结果相符 (图 2)。在荧光染色中, 染色体间距过小会导致染色体与染色较浅的中心粒不易区分, 计数困难。根据染色体形态, I、III、IV、V、VI 号染色体较易区分, 但是仅凭显微观察, II 号染色体很难确定是 1 条还是 2 条染色体, 为此我们观察了大量细胞, 并采用排除法确定其他染色体后, 发现不同的细胞中均存在这一形态的染色体, 再结合基因组组装得到的染色体大小、中心粒位置等信息, 判断 II 号是 1 条而不是 2 条染色体, 冬虫夏草菌的染色体数量更可能是 6 条, 而不是 7 条。即本研究中, 显微观察染色体的界定也参考了基因组的组装结果。在形态上, 6 条染色体存在明显差异, II 号染色体的形态较为独特, 类似于在白粉病菌 *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* 中报道的蝶形结构 (Borbye *et al.*, 1992)。

本文建立的染色体显微观察方法适用于虫生真菌染色体计数, 但染色体高度聚集的物种可能存在部分染色体区分不开的现象。补充端粒荧光探针染色的结果, 能大大提高效率以及结果的准确性。此外, PFGE 法也是显微观察的重要补充, 但 PFGE 法需要制备高质量未降解的染色体 DNA, 一般通过原生质体加蛋白酶处理后制备, 然后进行电泳分离 (Beadle *et al.*, 2003)。丝状真菌的菌丝如果不彻底处理成球状的原生质体, 必然会影响染色体 DNA 的迁移, 进而影响染色体数量的计算, 这也是 PFGE 法目前大多应用在单细胞酵母, 很少在丝状真菌中应用的原因 (Beadle *et al.*, 2003)。对于能产生芽生孢子的物种, 可以考虑将芽生孢子用于 PFGE 法来确定染色体数量。已组装出基因组完成图的物种, 染色体数量的确定不仅能评估组装结果的可靠性, 也能结合荧光原位杂交技术 (Fluorescence in situ hybridization) 等实现特定基因的染色体定位。

本文结合 Hi-C 辅助的基因组组装以及激光共聚焦荧光染色观察, 确定了冬虫夏草菌的染色体数量为 6 条。同时建立了一种采用芽生孢子来制备原生质体并用于染色体观察计数的方法, 可推广到其他真菌特别是广义虫草等虫生真菌。冬

虫夏草染色体数目的确定将有助于该物种的分子遗传学研究,为进一步揭示物种的生物学特性提供参考。

致谢: 感谢中国科学院动物研究所秦启联研究员提供最初实验所用的冬虫夏草芽生孢子培养液,中国科学院微生物研究所施一研究员提供昆虫细胞培养液。

参考文献 (References)

- Andrews S, 2010. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Barry EG, 1996. Fungal chromosome. *Journal of Genetics*, 75(3): 255–263.
- Beadle J, Wright M, Mcneely L, Bennett JW, 2003. Electrophoretic karyotype analysis in fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 53: 243–270.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B, 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114–2120.
- Borbye L, Linde-Laursen I, Christiansen SK, Giese H, 1992. The chromosome complement of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* analysed by light microscopy and field inversion gel electrophoresis. *Mycological Research*, 96(2): 97–102.
- Chen RY, Zhang W, WU QA, 1989. Chromosome numbers of some species in the family magnoliaceae in Yunnan of China. *Acta Botanica Yunnanica*, 11(2): 234–238. [陈瑞阳, 张玮, 武全安, 1989. 云南部分木兰科植物染色体数目报道. 云南植物研究, 11(2): 234–238.]
- Chen YF, Guo JM, 1984. Chromosome studies of mammals. *Zoological Research*, 5(S1): 52–63. [陈宜峰, 郭健民, 1984. 哺乳动物染色体研究. 动物学研究, 5(S1): 52–63.]
- Dai T, Taga M, 2001. Cytological karyotyping of three *Cochliobolus* spp. by the germ tube burst method. *Phytopathology*, 91(4): 354.
- Du QZ, 2014. Dissection of allelic variation underlying important traits in *Populus tomentosa* Carr by using joint linkage and linkage disequilibrium mapping. Doctoral dissertation. Beijing: Beijing Forestry University. [杜庆章, 2014. 利用连锁与连锁不平衡联合作图解析毛白杨重要性状的等位遗传变异. 博士学位论文. 北京: 北京林业大学.]
- Dudchenko O, Shamim MS, Batra SS, Durand NC, Musial NT, Mostofa R, Pham M, St Hilaire BG, Yao WJ, Stamenova E, Hoeger M, Nyquist SK, Korchina V, Pletch K, Flanagan PJ, Tomaszewicz A, McAloose D, Pérez Estrada C, Novak BJ, Omer AD, Aiden EL, 2018. The juicebox assembly tools module facilitates *de novo* assembly of mammalian genomes with chromosome-length scaffolds for under \$1000. *Biorxiv*, 254797.
- Guo BF, 2014. Karyotype analysis and FISH analysis of infection related genes in *Metarhizium acridum*. Master dissertation. Chongqing: Chongqing University of Technology. [郭冰峰, 2014. 绿僵菌染色体核型分析及其侵染相关基因的 FISH 分析. 硕士学位论文. 重庆: 重庆理工大学.]
- Hao XH, Tian LF, Yang X, Tan H, Zhang ZG, Li DP, 2014. Fruitbody development of *Amanita fuliginea* and the observation of nuclear behavior in the basidia. *Life Science Research*, 18(6): 511–515 [郝小花, 田连福, 杨校, 谭虹, 张志光, 李东屏, 2014. 灰花纹鹅膏菌(*Amanita fuliginea*)子实体发育及核相观察. 生命科学研究, 18(6): 511–515.]
- Holliday JC, Cleaver MP, 2008. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10(3): 219–234.
- Hu X, Zhang YJ, Xiao GH, Zheng P, Xia YL, Zhang XY, St Leger RJ, Liu XZ, Wang CS, 2013. Genome survey uncovers the secrets of sex and lifestyle in caterpillar fungus. *Chinese Science Bulletin*, 58(23): 2846–2854.
- Hu XD, Li Y, Ren SY, Yao YJ, 2016. Fluorescent staining of septa and nuclei in *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*. *Mycosystema*, 35(9): 1099–1105. [胡晓棣, 李熠, 任蜀豫, 姚一建, 2016. 冬虫夏草、蛹虫草菌丝隔膜和细胞核荧光染色. 菌物学报, 35(9): 1099–1105.]
- Iwano M, Fukui K, Takaichi S, Isogai A, 1997. Globular and fibrous structure in barley chromosomes revealed by high-resolution scanning electron microscopy. *Chromosome Research*, 5(5): 341–349.
- Jiao L, 2010. Phylogeographic study on *Ophiocordyceps sinensis*. Doctoral dissertation. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences. [焦磊, 2010. 冬虫夏草系统发育地理学研究. 博士学位论文. 北京: 中国科学院研究生院.]
- Li B, Yan LH, Shi BH, 2021. Overview and prospect of the methods for fungal karyotype analysis. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 51(1): 68–73. [李波, 严莉洪, 施碧红, 2021. 真菌核型分析方法概述与展望. 福建农业科技, 51(1): 68–73.]
- Li H, Durbin R, 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14): 1754–1760.
- Li WJ, Xia JM, Li QP, Zhang ZY, Zhang WW, Dong CH, Wei JC, Liu XZ, 2020. Developmental recording of the ghost-moth larvae after *ex situ* infection by *Ophiocordyceps sinensis*. *Science China Life Sciences*, 63(7): 1093–1095.

- Li Y, Hsiang T, Yang RH, Hu XD, Wang K, Wang WJ, Wang XL, Jiao L, Yao YJ, 2016. Comparison of different sequencing and assembly strategies for a repeat-rich fungal genome, *Ophiocordyceps sinensis*. *Journal of Microbiological Methods*, 128: 1–6.
- Liu J, Guo LN, Li ZW, Zhou Z, Li Z, Li Q, Bo XC, Wang SQ, Wang JL, Ma SC, Zheng J, Yang Y, 2020. Genomic analyses reveal evolutionary and geologic context for the plateau fungus *Ophiocordyceps sinensis*. *Chinese Medicine*, 15(1): 1–12.
- Liu W, Xiao Y, Bian YB, 2010. Research advance of molecular genetic linkage map in macrofungi. *Mycosystema*, 29(5): 629–635. [刘伟, 肖扬, 边银丙, 2010. 大型真菌分子遗传连锁图谱研究进展. *菌物学报*, 29(5): 629–635.]
- Liu ZY, Liang ZQ, Liu AY, 2003. Investigation on microcycle conidiation of ascospores and conidiogenous structures of anamorph of *Cordyceps sinensis*. *Guizhou Agricultural Sciences*, 31(1): 3–5. [刘作易, 梁宗琦, 刘爱英, 2003. 冬虫夏草子囊孢子萌发及其无性型观察. *贵州农业科学*, 31(1): 3–5.]
- McClintock B, 1945. *Neurospora*. I. Preliminary observations of the chromosomes of *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany*, 32: 671–678.
- O'Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, Amyotte G, Kleemann J, Torres MF, Damm U, Buiate EA, Epstein L, Alkan N, Altmüller J, Alvarado-Balderrama L, Bauser CA, Becker C, Birren BW, Chen ZH, Choi JY, Crouch JA, Duvick JP, Farman MA, Gan P, Heiman D, Henrissat B, Howard RJ, Kabbage M, Koch C, Kracher B, Kubo Y, Law AD, Lebrun MH, Lee YH, Miyara I, Moore N, Neumann U, Nordström K, Panaccione DG, Panstruga R, Place M, Proctor RH, Prusky D, Rech G, Reinhardt R, Rollins JA, Rounsley S, Schardl CL, Schwartz DC, Shenoy N, Shirasu K, Sikhakolli UR, Stüber K, Sukno SA, Sweigard JA, Takano Y, Takahara H, Trail F, Does HCVD, M Voll L, Will I, Young S, Zeng QD, Zhang JZ, Zhou SG, Dickman MB, Schulze-Lefert P, Themaat EVLV, Ma LJ, Vaillancourt LJ, 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44: 1060–1065.
- Pires AS, Azinheira HG, Cabral A, Tavares S, Tavares D, Castro M, Várzea V, Silva MC, Abranches R, Loureiro J, Talhinhos P, 2016. Cytogenomic characterization of *Colletotrichum kahawae*, the causal agent of coffee berry disease, reveals diversity in minichromosome profiles and genome size expansion. *Plant Pathology*, 65(6): 968–977.
- Poma A, Pacioni G, Ranalli R, Miranda M, 1998. Ploidy and chromosomal number in *Tuber aestivum*. *FEMS Microbiology Letters*, 167(1): 101–105.
- Rong YW, Li CR, Fan MZ, Li ZZ, 2010. The karyotype analysis of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. by CHEF electrophoresis. *Mycosystema*, 29(3): 373–378. [荣跃文, 李春如, 樊美珍, 李增智, 2010. 拟青霉属虫生真菌核型的脉冲电泳分析. *菌物学报*, 29(3): 373–378.]
- Schwartz DC, Cantor CR, 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1): 67–75.
- Servant N, Varoquaux N, Lajoie BR, Viara E, Chen CJ, Vert JP, Heard E, Dekker J, Barillot E, 2015. HiC-Pro: An optimized and flexible pipeline for Hi-C data processing. *Genome Biology*, 16(12): 259.
- Shi LG, 2000. Studies on the protoplasts and karyotype of *Metarhizium anisopliae* var. *majus* an entomogenous fungus. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 8(3): 271–274. [时连根, 2000. 绿僵菌大孢种的原生质体及其染色体组型研究. *农业生物技术学报*, 8(3): 271–274.]
- Shirane N, Masuko M, Hayashi Y, 1989. Light microscopic observation of nuclei and mitotic chromosomes of botrytis species. *Phytopathology*, 79: 728–730.
- Shu R, Zhang J, Meng Q, Zhang H, Zhou GL, Li MM, Wu PP, Zhao YN, Chen C, Qin QL, 2020. A new high-quality draft genome assembly of the Chinese cordyceps *Ophiocordyceps sinensis*. *Genome Biology and Evolution*, 12(7): 1074–1079.
- Song WJ, Liu ZB, Zhu H, Huang B, Li ZZ, 2011. Morphogenesis of blastospores of ten species of entomopathogenic fungi. *Mycosystema*, 30(4): 572–579. [宋文婧, 刘振邦, 朱虹, 黄勃, 李增智, 2011. 十种虫生真菌液体培养芽生孢子的形态发生. *菌物学报*, 30(4): 572–579.]
- Taga M, Murata M, 1994. Visualization of mitotic chromosomes in filamentous fungi by fluorescence staining and fluorescence in situ hybridization. *Chromosoma*, 103(6): 408–413.
- Tsuchiya D, Koga H, Taga M, 2004. Scanning electron microscopy of mitotic nuclei and chromosomes in filamentous fungi. *Mycologia*, 96(2): 208–210.
- Varoquaux N, Liachko I, Ay F, Burton JN, Shendure J, Dunham MJ, Vert JP, Noble SW, 2015. Accurate identification of centromere locations in yeast genomes using Hi-C. *Nucleic Acids Research*, 43(11): 5331–5339.
- Vaser R, Sović I, Nagarajan N, Šikić M, 2017. Fast and accurate *de novo* genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Research*, 27(5): 737–746.
- Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CA, Zeng QD, Wortman J, Young SK, Earl AM, 2014.

- Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS ONE*, 9(11): e112963.
- Wang XY, Rong YW, Xu L, Zhang NS, Li CR, Fan MZ, 2010. Electrophoretic karyotype analysis of *Paecilomyces militaris*, the anamorph of *Cordyceps militaris*. *Journal of Anhui Agricultural University*, 37(4): 716–719. [汪小艳, 荣跃文, 徐莉, 章能胜, 李春如, 樊美珍, 2010. 蛹虫草无性型蛹草拟青霉的电泳核型分析. *安徽农业大学学报*, 37(4): 716–719.]
- Wanner G, Schroederreiter E, 2008. Scanning electron microscopy of chromosomes. *Methods in Cell Biology*, 88(8): 451.
- Wieloch W, 2006. Chromosome visualization in filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 67(1): 1–8.
- Xia EH, Yang DR, Jiang JJ, Zhang QJ, Liu Y, Liu YL, Zhang Y, Zhang HB, Shi C, Tong Y, Kim C, Chen H, Peng YQ, Yu Y, Zhang WE, Eichler E, Gao LZ, 2017. The caterpillar fungus, *Ophiocordyceps sinensis*, genome provides insights into highland adaptation of fungal pathogenicity. *Scientific Reports*, 7(1): 1806.
- Yan Y, Li Y, Wang WJ, He JS, Yang RH, Wu HJ, Wang XL, Jiao L, Tang Z, Yao YJ, 2017. Range shifts in response to climate change of *Ophiocordyceps sinensis*, a fungus endemic to the Tibetan Plateau. *Biological Conservation*, 206: 143–150.
- Yao YJ, Wei JC, Zhuang WY, Cai L, Liu DM, Li JS, Wei TZ, Li Y, Wang K, Wu HJ, 2020. Development of red list assessment of macrofungi in China. *Biodiversity Science*, 28(1): 4–10. [姚一建, 魏江春, 庄文颖, 蔡蕾, 刘冬梅, 李俊生, 魏铁铮, 李熠, 王科, 吴海军, 2020. 中国大型真菌红色名录评估研究进展. *生物多样性*, 28(1): 4–10.]
- Zhang X, 2019. Correlation between minichromosome and pathogenicity differentiation of *Colletotrichum fructicola*. Master dissertation. Xian: Northwest A&F University. [张欣, 2019. 小染色体与果生刺盘孢致病分化关联性分析. 硕士学位论文. 西安: 西北农林科技大学.]
- Zhang X, Zhang S, Zhao Q, Ming R, Tang HB, 2019. Assembly of allele-aware, chromosomal-scale autopolyploid genomes based on Hi-C data. *Nature Plants*, 5: 833–845.