

# 我国人工栽培和野生黑色羊肚菌的 菌种鉴定及系统发育分析

何培新<sup>1</sup>, 刘伟<sup>1,2</sup>, 蔡英丽<sup>3</sup>, 贺新生<sup>4</sup>

- (1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;
2. 中国科学院 水生生物研究所, 湖北 武汉 430072;
3. 华中农业大学 应用真菌研究所, 湖北 武汉 430071;
4. 西南科技大学 生命科学学院, 四川 绵阳 621002)

**摘要:**采用常规形态学原理,结合核糖体 DNA 转录间隔区(ITS)序列分析技术,对我国4个羊肚菌主要栽培菌株和5个主要采集自川渝地区的野生分离物进行菌株鉴定和系统发育分析,研究遵循羊肚菌 MLST 数据库的序列鉴定程序,基于系统研究过的可靠序列信息,对获得的 ITS 序列进行逐一比对,选取相似度靠前的信息,构建系统发育树.结果表明,目前我国大面积种植的羊肚菌分别为梯纹羊肚菌、六妹羊肚菌和七妹羊肚菌;5个野生种质分别鉴定为梯纹羊肚菌和高羊肚菌.

**关键词:**羊肚菌;ITS 序列分析技术;菌种鉴定;系统发育;种质资源

**中图分类号:**Q93;S567.3 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2015.3/4.006

## Strain identification and phylogenetic analysis of cultivated and wild strains of *Morchella* belonging to *Elata Clade* in China

HE Pei-xin<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>1,2</sup>, CAI Ying-li<sup>2</sup>, HE Xin-sheng<sup>3</sup>

- (1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;
3. Institute of Applied Mycology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430071, China;
4. College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621002, China)

**Abstract:** Applying regular morphology combined with the technology of ITS sequence analysis, the identification and phylogenetic analysis of the 4 cultivated strains and 5 wild morel isolates mainly collected from Sichuan province and Chongqing municipality were carried out. The study followed the sequence identification program required by data bank of multilocus sequence typing(MLST). The phylogenetic tree was constructed with reliable sequences obtained from BLAST one-by-one comparison. The results suggested that the cultivated morel varieties were identified as *Morchella importuna*, *M. sextelata* and *M. septimelata*. In addition, 5 wild isolates were identified as *M. elata* and *M. importuna*, respectively.

**Key words:** *Morchella*; ITS sequence analysis technique; strain identification; phylogenetic; germplasm resource

收稿日期:2015-04-08

基金项目:河南省科技创新杰出青年项目(134100510017)

作者简介:何培新(1970—),男,河南省民权县人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为菌类生物技术.

通信作者:刘伟(1984—),男,河南省镇平县人,中国科学院水生生物研究所助理研究员,硕士,主要研究方向为微生物遗传.

## 0 引言

羊肚菌(*Morchella*)隶属于子囊菌亚门(Ascomycotina),是世界性分布的珍稀名贵食用菌,具有较大的食用和药用价值<sup>[1]</sup>。虽然羊肚菌野生种质资源比较丰富,但是仅靠人工采集仍难以满足市场需求,且大量采集也会破坏羊肚菌的自然生态,造成种质资源的不断减少。近年来,我国人工栽培羊肚菌(主要是黑色羊肚菌支系的种类)取得了突破性进展,特别是川渝一带的“大田人工羊肚菌栽培技术”<sup>[2]</sup>,推广面积不断扩大。然而,目前我国羊肚菌的人工栽培也面临着很多亟待解决的问题,其中,还未确定广泛栽培品种的分类地位等问题比较突出,在一定程度上制约了羊肚菌产业的健康、稳定和长远发展。

基于宏观和微观形态特征的传统分类所造成的羊肚菌同物异名和异物同名的现象比较严重<sup>[1]</sup>。核糖体 DNA 转录间隔区 ITS(internal transcribed spacer)序列分析技术广泛用于真菌的分子鉴定和系统发育分析<sup>[3-4]</sup>,然而,由于基因库(Genbank)ITS数据是由不同作者提交的,可能存在着定种不准确等问题,影响基于 ITS 序列分析的鉴定结果。鉴于此,J. W. Taylor 等<sup>[5]</sup>采用多基因谱系一致性系统发育物种识别法,通过分析多个基因的 DNA 序列来界定物种,使分类与鉴定结果更加科学和客观。该技术有效地应用于羊肚菌的分类和系统发育分析,提出羊肚菌属由黄色羊肚菌支系(*Esculenta Clade*)、黑色羊肚菌支系(*Elata Clade*)和变红羊肚菌支系(*Rufobrunnea Clade*)构成<sup>[6-8]</sup>;开发了羊肚菌多基因序列模标数据库 MLST(multilocus sequence typing),收录了大量准确鉴定的羊肚菌分子信息<sup>[9]</sup>。本文拟采用常规形态学原理,结合 ITS 序列分析技术,对目前我国广泛使用的黑色羊肚菌支系的 4 个栽培品种和 5 个主要采集于川渝地区的野生分离物进行分子鉴定和系统发育分析,以期规范我国羊肚菌人工栽培及野生羊肚菌驯化和菌种选育等提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

主要材料:羊肚菌野生分离物 M-4, M-12, M-14, M-15 和 M-19,组织分离自各地采集的野

生子囊果,子囊果发生地详见图 1。栽培菌株 M-16, M-17, M-18 和 M-20 的商业名称分别为羊肚菌 1 号、3 号、6 号和 7 号,由重庆市彭水县诚志食用菌股份合作社提供,其余标出基因号的材料均来自基因库。

试剂:酵母粉、胰蛋白胨,均为生化试剂,北京双旋微生物培养基制品厂产;Tris 碱、EDTA,均为分析纯,上海生工生物工程有限公司产;琼脂糖、琼脂粉,均为生化试剂,西班牙 Biowest 公司产;葡萄糖、氯化钠、冰乙酸和氢氧化钠,均为分析纯,国药上海化学试剂公司产;真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(Ezup)、PCR 扩增试剂盒(Taq)、柱式 DNA 胶回收试剂盒(UNIQ-10)、T-载体 PCR 产物克隆试剂盒、染色剂和凝胶上样缓冲液,均购自上海生工生物工程有限公司;ITS<sub>1</sub> 和 ITS<sub>4</sub> 特异扩增引物,均由上海生工生物工程有限公司合成;DL2000 DNA Marker,宝生物工程(大连)有限公司产。

仪器:CF16RXII 高速冷冻离心机,日本株式会社日立制作所产;PCR 仪(P×2),美国 Thermo Electron 产;UV2000 紫外/可见分光光度计,上海凤凰光学科仪有限公司产;BioRad 3000 双恒电泳仪,美国 BioRad 公司产;BS200S 电子分析天平,北京赛多利斯天平有限公司产;ULTRA-LUM OMEGA 10 凝胶成像系统,美国 OMEGA 公司产;HH-4 电热数字恒温水浴锅,常州国华电器有限公司产;SPX-160B-2 恒温培养箱,上海福玛实验设备有限公司产;101A-1 电热恒温鼓风干燥箱,上海市实验仪器总厂产;DSX-280A 不锈钢手提式灭菌锅,上海申安医疗器械厂产;SN-CJ IFD 超净化工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司产;Zeiss A1 显微镜,德国 Zeiss 公司产。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 形态学鉴定** 供试分离物首先通过菌丝形态、产色素情况和菌核性状等进行初步鉴定,并结合子囊果宏观形态和子囊、侧丝、子囊孢子等微观形态特征,进行传统分类学鉴定<sup>[11]</sup>。

**1.2.2 分子鉴定和系统发育分析** 羊肚菌菌丝体培养、基因组 DNA 提取、ITS 序列扩增与测序、序列比对分析等参见文献[12]。序列测定后,通过测序峰图去掉两端低质量的测序碱基,并进行合并拼接,获得完整的 ITS 序列数据。将拼接完整的数据与经过系统研究的相关基因序列一起进行系统发育分析。系统发

育分析采用 Clustal X 和 MEGA 5.0 软件进行:原始数据首先通过 Clustal X 比对对齐,获得 aln 文件;通过 MEGA 5.0 读取 aln 文件,转换为 meg 格式,构建泊松检测系统发育树.发育树构建采用 NJ 法(邻近遗传距离法),泊松值设定为 1 000,种子选定为“随机”,其他参数均设定为软件默认参数<sup>[13]</sup>.

## 2 结果与讨论

图 1 为黑色羊肚菌支系栽培及野生种类的系统发育聚类图.常规形态学特征结合 ITS 序列分析鉴定结果表明,羊肚菌 1 号和羊肚菌 3 号为梯纹羊肚菌 (*M. importuna*),羊肚菌 6 号为六妹羊肚菌 (*M. sextelata*),羊肚菌 7 号为七妹羊肚菌 (*M. septimelata*).它们均被聚类于黑色羊肚菌支系.

梯纹羊肚菌目前在我国栽培应用最为广泛,占种植面积的 95% 以上.王波等<sup>[2]</sup>对成都市大邑县、

崇州市、郫县和涪城区的羊肚菌栽培品种进行了鉴定,发现栽培品种都是梯纹羊肚菌.羊肚菌 1 号是目前我国推广应用最广的品种,该品种原基初期细长,高 5 ~ 8 mm,直径 2 ~ 3 mm,豆芽状,浅白色或米白色;原基发育 2 ~ 3 d 后,分化出菌盖和菌柄,表现为二者分离,菌盖灰白色、浅灰色,菌柄基部有细绒毛;3 ~ 5 d 后,菌盖颜色加深,表现为黑褐色、灰黑色,开始分化形成脊,菌柄基部稍膨大,有沟痕出现;原基出现后 15 ~ 25 d 子实体成熟(气温不同,子实体成熟需要的时间不等).成熟子囊果菌盖颜色比幼嫩时稍浅,呈浅灰色、灰黑色或浅褐色,脊竖直排列,与菌盖等表面横隔,与脊垂直,呈梯格状.羊肚菌 1 号菇型稳定,变异度小;适应 6 ~ 23 °C 较宽温度范围,出菇周期长.羊肚菌 3 号主要在原基形态和分化时间方面与 1 号品种不同:原基短粗,高 3 ~ 5 mm,直径 2 ~ 3 mm;菌盖与菌柄分化较早,通常在

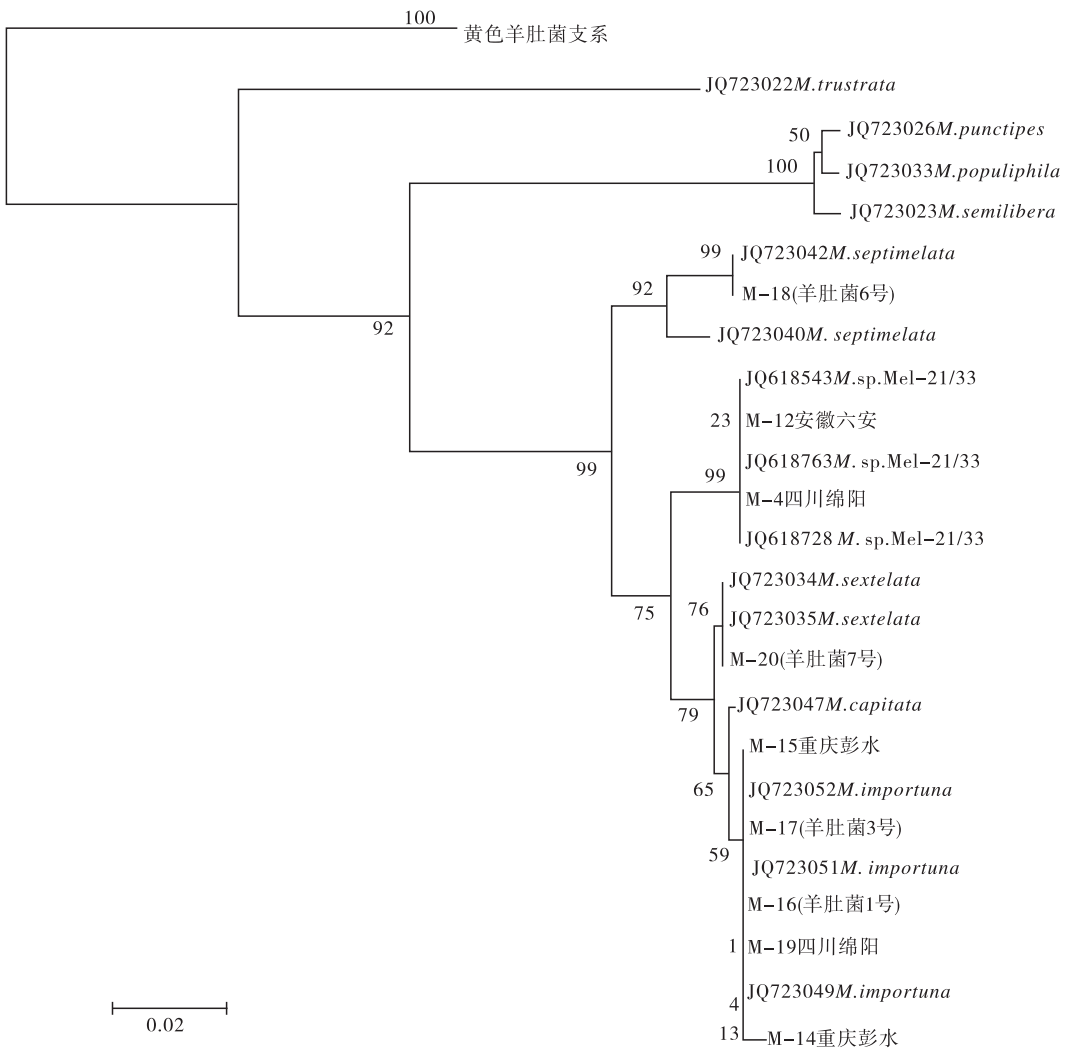


图 1 黑色羊肚菌支系栽培及野生种类的系统发育聚类图

能观察到原基的时候,菌盖已经开始分化;此外,3号品种是爆发性出菇,出菇密度较高。

六妹羊肚菌和七妹羊肚菌是近年来才被描述的两个品种<sup>[8-9,14-15]</sup>,呈欧洲-东亚-美洲间断式分布。二者的宏观和微观形态没有明显差异,但ITS等保守基因序列却差异较大,因此被定义为两个不同的品种<sup>[14]</sup>。这两种羊肚菌同属于黑色羊肚菌支系,主要形态特征为:子囊果中等偏大(8~14 cm);随着子囊果的成熟,菌盖颜色由棕黄色、金黄色逐渐加深;菌柄与菌盖之间的连接处有细微可辨的凹痕。我国六妹羊肚菌和七妹羊肚菌主要自然生长于云南省,曾被认为是“最易成功栽培”的喜火烧地的黑色羊肚菌种类<sup>[1,14,16]</sup>;然而这两种羊肚菌目前在我国的栽培面积不大,但其产量与梯纹羊肚菌相当,因而具有很好的开发利用前景。

野生羊肚菌自然种质中,自然生长于四川绵阳的M-4和安徽六安的M-12为高羊肚菌(*M. elata*),重庆彭水的2个分离物(M-14和M-15)与来自四川绵阳的M-19为梯纹羊肚菌(图1),表明我国川渝地区羊肚菌自然种质资源非常丰富,这与前人的报道一致<sup>[9,17]</sup>。高羊肚菌野生种质资源也比较丰富,是有待于进一步开发利用的另一个种类。

### 3 结论

本文采用常规形态学原理,结合ITS序列分析技术,将目前我国广泛人工栽培的羊肚菌品种鉴定为梯纹羊肚菌、六妹羊肚菌和七妹羊肚菌,其中,梯纹羊肚菌为主要的栽培种类,六妹羊肚菌和七妹羊肚菌的人工栽培有待于进一步推广应用;5个野生种质分别被鉴定为梯纹羊肚菌和高羊肚菌。分析鉴定结果表明,我国蕴含着丰富的野生羊肚菌种质资源,可为人工驯化栽培和菌种选育提供大量素材,有利于我国羊肚菌产业的持续和长远发展。

#### 参考文献:

[1] 杜习慧,赵琪,杨祝良.羊肚菌的多样性、演化历史及栽培研究进展[J].菌物学报,2014,33(2):183.  
 [2] 王波,鲜灵.人工栽培羊肚菌的鉴定[J].西南农业学报,2013,26(5):1988.  
 [3] Ohyanagi H,Ikeo K,Gojobori T. Eukaryotic nuclear structure explains the evolutionary rate difference of ribosome export factors [J]. Gene,2008,421(1/2):7.

[4] Fischer M,Binder M. Species recognition,geographic distribution and host-pathogen relationships;a case study in a group of lignicolous basidiomycetes,*Phellinus* s. l. [J]. Mycologia,2004,96(4):799.  
 [5] Taylor J W,Jacobson D J,Kroken S,et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi [J]. Fungal Genetics and Biology,2000,31(1):21.  
 [6] O'Donnell K,Rooney A P,Mills G L,et al. Phylogeny and historical biogeography of true morels (*Morchella*) reveals an early Cretaceous origin and high continental endemism and provincialism in the Holarctic [J]. Fungal Genetics and Biology,2010,48(3):252.  
 [7] Taşkın H,Büyükalaca S,Dogan H H,et al. A multigene molecular phylogenetic assessment of true morels (*Morchella*) in Turkey [J]. Fungal Genetics and Biology,2010,47(8):672.  
 [8] Taşkın H,Büyükalaca S,Hansen K,et al. Multilocus phylogenetic analysis of true morels (*Morchella*) reveals high levels of endemics in Turkey relative to other regions of Europe [J]. Mycologia,2012,104(2):446.  
 [9] Du X H,Zhao Q,Yang Z L,Hansen K,et al. How well do ITS rDNA sequences differentiate species of true morels (*Morchella*)? [J]. Mycologia,2012,104(6):1351.  
 [10] 何培新,刘伟,贺新生,等.粗柄羊肚菌内生真菌多样性研究[J].郑州轻工业学院学报:自然科学版,2014,29(3):1.  
 [11] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.  
 [12] 刘如钢,魏涛,何培新,等.裸盖菇属的真菌鉴定及分子系统学初探[J].微生物学通报,2006,33(2):44.  
 [13] Bunyard B A. A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene [J]. Mycologia,1994,86(6):762.  
 [14] Kuo M,Dewsbury D R,O'Donnell K,et al. Taxonomic revision of true morels (*Morchella*) in Canada and the United States [J]. Mycologia,2012,104(5):1159.  
 [15] Richard F,Bellanger J M,Clowez P,et al. True morels (*Morchella*,*Pezizales*) of Europe and North America:evolutionary relationships inferred from multilocus data and a unified taxonomy [J]. Mycologia,2015,107(2):359.  
 [16] 臧穆.东喜马拉雅引人注目的高等真菌和新种[J].云南植物研究,1987(1):81.  
 [17] Du X H,Zhao Q,O'Donnell K,et al. Multigene molecular phylogenetics reveals true morels (*Morchella*) are especially species-rich in China [J]. Fungal Genetics and Biology,2012,49(6):455.