



刘伟,蔡英丽,马晓龙,等.羊肚菌生产菌株栽培适宜性评价系统[J].轻工学报,2022,37(3):50-57.

LIU W, CAI Y L, MA X L, et al. Evaluation system of cultivating suitability for the productive strains of *Morchella* mushrooms[J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(3): 50-57. DOI: 10.12187/2022.03.007

# 羊肚菌生产菌株栽培适宜性评价系统

刘伟<sup>1</sup>, 蔡英丽<sup>2</sup>, 马晓龙<sup>2</sup>, 何培新<sup>3</sup>

1. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650201;
2. 武汉市农业科学院蔬菜研究所, 湖北武汉 430345;
3. 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南郑州 450001

**摘要:** 羊肚菌是世界知名的食药兼用真菌。自2012年以来,我国羊肚菌人工栽培的规模不断扩大,然而生产不稳定一直困扰着羊肚菌产业的发展。造成羊肚菌生产不稳定的重要原因是菌株栽培适宜性评价技术不完善、栽培菌株质量不稳定等。与分类学属于担子菌门的大多数食用菌相比,属于子囊菌门的羊肚菌在物种多样性、交配型基因丢失、快速老化等方面表现突出,因而关于其栽培菌株相关性状的检测要求更高。基于长期理论研究和生产实践经验,提出了包括菌株身份(Identity)识别、交配型(Mating Type)基因检测和菌株活力(Vitality)测定的羊肚菌生产菌株栽培适宜性IMV评价系统,叙述了该评价系统的技术必要性和具体操作方法。两个产季的大田栽培实际应用情况表明,该评价系统可以实现对羊肚菌生产菌株的科学、系统的筛选与评估,以确保适宜菌株用于人工栽培,增加羊肚菌人工栽培的稳定性,进而推动羊肚菌产业的持续和稳定发展。

**关键词:** 羊肚菌; 菌株鉴定; 交配型基因; 菌株老化; IMV评价系统

**中图分类号:** TS255.1; S646 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2022)03-0050-08

## 0 引言

羊肚菌(*Morchella* spp.)是一类名贵的食药兼用真菌,百余年来,科技工作者一直致力于羊肚菌的栽培驯化研究,然而直到1982年才由美国学者R. D. Ower真正实现了室内栽培,并进行了商业化生产,但由于羊肚菌栽培稳定性较差,故并未实现长期运营<sup>[1-3]</sup>。我国自20世纪50年代开始进行羊肚菌的栽培驯化研究,经历了仿生栽培、堆木栽培、菌根化栽培等模式,直至本世纪初,首次在川渝地区成功实现了以外源营养袋为核心技术的羊肚菌大田栽培,并于2012年走上商业化生产道路。2020—2021产季

的羊肚菌栽培面积已超过15万亩(1亩=667 m<sup>2</sup>),九年间增长了50余倍,遍布全国各地<sup>[4-6]</sup>。然而,羊肚菌产业快速发展的背后是近乎70%的种植者无法稳定盈利。除了平棚和简易冷棚栽培管理模式无法抵御异常气候变化等因素的影响,羊肚菌的育种和制种技术不够统一和规范,菌种评价技术不够科学和完善,也是造成栽培菌种质量不稳定,乃至生产不稳定的重要原因<sup>[5,7-8]</sup>。

菌种是羊肚菌人工栽培的关键。2015年之前,全行业每年约有30%~40%的栽培面积不出菇或出菇质量较差,一个重要的原因是推广使用了如黑脉羊肚菌(*M. angusticeps*)、高羊肚菌(*M. elata*)、黄色

收稿日期:2021-05-06;修回日期:2022-03-10

基金项目:云南省基础研究专项面上项目(202101AT070541)

作者简介:刘伟(1984—),男,河南省镇平县人,中国科学院昆明植物研究所助理研究员,博士,主要研究方向为食用菌遗传育种。E-mail: zhenpingliuwei@163.com

通信作者:何培新(1970—),男,河南省民权县人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为真菌生物技术和发酵工程。E-mail: hepeixin@zzuli.edu.cn

羊肚菌类群 (Esculenta clade) 等非可栽培种类。目前,随着对羊肚菌可栽培种类的认知愈加明确,因种类选择不当而导致大面积不出菇的现象已大大减少<sup>[9-10]</sup>。最近研究<sup>[11]</sup>发现,羊肚菌组织分离物(潜在栽培菌株)存在较大比例的交配型基因丢失现象。随着继代培养时间和代数的延续,羊肚菌菌株老化加剧,表现为菌核发生减少、色素产生提前、生长速率下降和细胞死亡事件发生;老化菌株用于栽培会导致产量急剧下降<sup>[12-13]</sup>。上述问题均直接影响了羊肚菌栽培的稳定性。为了解决这些问题,本文总结了相关的理论研究成果和生产实践经验,提出了一套以身份 (Identity) 识别、交配型 (Mating Type) 基因检测和菌株活力 (Vitality) 测定为主要内容的羊肚菌生产菌株栽培适宜性 IMV 评价系统,在概述该评价系统的理论和技术原理的基础上,阐述了每项评价技术的具体操作方法,以实际应用效果验证该评价系统的可行性,以期促进该评价系统的广泛应用,为提高我国羊肚菌人工栽培的稳定性,促进羊肚菌产业持续稳定和健康发展提供技术支撑。

## 1 羊肚菌菌株身份识别

### 1.1 羊肚菌潜在栽培菌株分类地位确定的必要性

羊肚菌子囊果形态多变,易受环境条件的影响,因此羊肚菌属以下的分类一直是行业难题<sup>[14]</sup>。多基因联合系统发育树的构建为羊肚菌菌种的分类和鉴定确立了新的准则。目前全球共确定了 78 个系统发育学种,而我国至少分布着 30 个种<sup>[15-19]</sup>。早期驯化研究均缺乏物种分类鉴定的内容,因此很难判定这些驯化栽培种类(如尖顶羊肚菌 (*M. conica*)、黑脉羊肚菌、粗柄羊肚菌 (*M. cassipes*)、羊肚菌 (*M. esculenta*) 和小羊肚菌 (*M. deliciosa*)) 分类地位的准确性;另外,它们也无进一步的栽培报道或推广应用<sup>[4]</sup>。因此,可以判定除目前广泛应用的 3 个黑色羊肚菌类群 (Elata clade) 种类(梯棱羊肚菌 (*M. importuna*)、六妹羊肚菌 (*M. sextelata*) 和七妹羊肚菌 (*M. eximia*)) 以外,其他曾被报道的驯化研究种类很难借助当前的栽培模式进行人工栽培,或者不具有商业栽培价值<sup>[9,20]</sup>。除此之外,红褐羊肚菌 (*M. rufobrunnea*) 也容易驯化出菇,美国和以色列的栽培

研究均采用该菌种进行<sup>[21-23]</sup>。杜习慧<sup>[24]</sup>研究指出,除梯棱羊肚菌、六妹羊肚菌和七妹羊肚菌以外, *Mel-6* 至 *Mel-10* 支系中的其他几个菌种也可以栽培出菇。综上可以初步确定,以当前栽培模式为基础的可栽培羊肚菌有 7 种,分别为梯棱羊肚菌、六妹羊肚菌、七妹羊肚菌、头丝羊肚菌 (*M. exuberans*)、欧氏羊肚菌 (*M. ownneri*)、*Mel-13* 和 *Mel-21*,而生产中主要对前 3 种进行大面积推广应用。由此可以断定,以外源营养袋为能量供给的羊肚菌大田栽培模式只适合于部分羊肚菌种类。因此,不要盲目将野生羊肚菌分离菌株和其他来源不明的菌株应用于规模化生产。在大生产应用之前,务必先确定推广菌株的分类地位,明确其是否属于目前适宜栽培的种类。

### 1.2 羊肚菌菌株身份识别方法

虽然构建多基因系统发育树是羊肚菌物种鉴定的标准<sup>[15-19]</sup>,但采用单一的核糖体基因内转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, ITS) 序列分析即可准确鉴定大多数羊肚菌种类,满足栽培菌株身份识别的需要。但在羊肚菌分类鉴定的科研工作中,新种的鉴定必须整合形态特征、生理生化特征、多个保守基因序列分析等性状进行。目前,ITS 序列扩增和测序分析技术均已较成熟,本文将结合羊肚菌的特点阐述菌株身份识别方法:

1) 菌丝体纯培养。将活化培养的菌株菌丝块接种于 CYM(葡萄糖 20 g,酵母膏 2 g,蛋白胨 2 g,  $K_2HPO_4$  1 g,  $MgSO_4$  0.5 g,  $KH_2PO_4$  0.46 g,蒸馏水 1000 mL, pH 自然) 或 PD(土豆 200 g 煮汁,葡萄糖 20 g,自来水 1000 mL, pH 自然) 液体培养基中,于 20~23 °C 条件下静置培养 7 d,捞取菌丝体,用无菌水清洗 2~3 次,再用洁净吸水纸吸干水分, -80 °C 保存备用或直接使用。

2) 基因组 DNA 提取。加入液氮后,将菌丝体研磨成粉末;取约 50~100  $\mu$ L 粉末,加入 700  $\mu$ L 裂解液 (CTAB 2%(质量分数), PVP 2%(质量分数), Tris-HCl 100 mmol/L, EDTA 20 mmol/L, NaCl 1.4 mol/L), 于 60~65 °C 条件下裂解 20 min 后,于 12 000 r/min 条件下离心 10 min;上清液加入等体积的 PCA (V(苯酚): V(氯仿): V(异戊醇) = 25:24:1), 颠倒混匀后于 12 000 r/min 条件下离心 10 min;上清液加入等体

积 CA(V(氯仿):V(异戊醇)=24:1),颠倒混匀后于 12 000 r/min 条件下离心 10 min;上清液加入 1/10 体积的乙酸钠溶液(3 mol/L),再加入 2 倍体积的无水乙醇,置于-20 ℃、30 min 条件下沉淀基因组 DNA;于 12 000 r/min 条件下离心 5 min 获得基因组 DNA,用 1 mL 75%(体积分数)乙醇溶液清洗盐离子后,再用含 1%(体积分数)RNase A 的 TE 缓冲液(Tris-HCl 10 mmol/L,EDTA 1 mmol/L)溶解基因组 DNA,于 37 ℃ 条件下水浴 1 h 以消解 RNA,最终获得高质量基因组 DNA 母液。采用紫外分光光度计测定该母液质量浓度,再稀释为 DNA 质量浓度为 50 ng/μL 的工作液,于 4 ℃ 条件下保存备用。

3)PCR 扩增。选择 ITS 通用引物 ITS<sub>1</sub>/ITS<sub>4</sub>(5'→3',下同):TCCGTAGGTGAACCTGCGG/TCCTCCGCT-TATTGATATGC。PCR 反应体系为:PCR Buffer 1×,MgCl<sub>2</sub>1.50 mmol/L,dNTPs Mix 0.25 mmol/L,引物各 0.25 μmol/L,rTaq DNA 聚合酶 1.5 U,模板 DNA 50 ng;或 PCR MIX 1×(包含 dNTP、Mg<sup>2+</sup>、核酸染料),引物各 0.25 μmol/L,模板 DNA 50 ng。反应条件为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,34 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。

4)测序分析。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测合格后(黑色羊肚菌类群菌株条带约 800 bp,黄色羊肚菌类群菌株条带约 1200 bp),直接送至测序公司进行双向测序。

5)数据库比对。获得测序结果后,检测测序质量,剔除两端的低质量碱基,拼接获得完整的 ITS 序列;提交至 NCBI 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 blastn 比对,初步确定样品的分类地位。

(6)构建系统发育树。下载公开发表的参考 ITS 序列,使用 MEGA、PAUP、MrBayes 等软件构建菌株系统发育树,初步确定目标菌株的分类地位。

## 2 羊肚菌菌株交配型基因测定

### 2.1 羊肚菌潜在栽培菌株交配型基因测定的必要性

同宗结合或异宗结合是羊肚菌的关键生活史类型<sup>[25]</sup>。交配型基因控制着真菌的性发育。子囊菌通常含有 2 种交配型位点(Mat1-1 和 Mat1-2),根据

这 2 种位点是否位于同一个细胞核,可以判定该物种的生活史类型;另外,在异宗结合真菌中,这 2 种位点也被用于代表不同的核相<sup>[26]</sup>。基础研究<sup>[26-32]</sup>表明,梯棱羊肚菌、六妹羊肚菌、七妹羊肚菌等可栽培羊肚菌种类均属于异宗结合生活史类型。异宗结合真菌在其生活史中需要不同交配型的初级菌丝融合形成具有 2 种交配型位点的次级菌丝方可出菇。虽然早期研究<sup>[3]</sup>及近年栽培实践<sup>[26]</sup>均有羊肚菌单孢菌株出菇的案例,但检测单孢菌株栽培出菇获得的子囊果的交配型基因发现,单孢出菇实为“假性出菇”,其实质是在种植过程中引入了互补交配型的核相<sup>[26]</sup>。刘萍等<sup>[33]</sup>研究指出,在一些梯棱羊肚菌和六妹羊肚菌的子囊果标本中可检测到较小比例的异核体单孢子,同时含有 2 种交配型基因,即存在假同宗结合现象,可直接栽培出菇。然而,异核体单孢子群体所占比例较低,羊肚菌子囊果的单孢分离菌株群体大多仍只含 1 种交配型位点,即 Mat1-1 或 Mat1-2<sup>[30]</sup>。

笔者检测了来源于不同地区的 3 个梯棱羊肚菌、5 个七妹羊肚菌和 11 个六妹羊肚菌菌株栽培出菇的子囊果和 3 个野生高羊肚菌的子囊果(共计 22 份样品、24 批次组织分离的 348 份分离物)的交配型基因结构,发现其中 151 份分离物只检测到 1 种交配型基因,整体交配型基因的缺失率为 43.4%<sup>[11]</sup>。蛹虫草(*Cordyceps militaris*)交配型基因缺失会导致菌株生产性状退化,造成不出菇<sup>[34]</sup>。当前尚无有关羊肚菌菌株产量高低与交配型基因关系的研究报道。然而可以确定,将只含 1 种交配型的羊肚菌菌株直接用于生产存在风险。多孢分离是食用菌育种常用的技术手段。多孢分离物虽然能保证交配型基因的完整性,但发生减数分裂形成子囊孢子的萌发菌株的性状分离明显,将其作为育种材料是可行的,若直接用于生产则面临性状不一致的局面,不利于栽培的稳定性<sup>[1]</sup>,因而建议仍采取组织分离技术获得生产菌株。由于组织分离物存在较普遍的交配型缺失现象,因此必须对组织分离获得的菌株(潜在生产菌株)进行交配型基因测定,以确保基因型的完整性。

### 2.2 羊肚菌交配型基因测定方法

羊肚菌交配型基因的测定方法已有不少研

究<sup>[26-29]</sup>,笔者主要阐述更适用于生产实践的测定方法,即完成菌丝体培养和基因组 DNA 提取(见 1.2)后,采用特异性引物扩增交配型基因片段,从而确定菌株的交配型。

1)特异性引物。Mat1-1-1TF/R:AAAACGCTCTATCGCCACCA/TGCGAAGTTGCGTTTTTCAGG;Mat1-2-1TF/R:ATGAAGGCTGTTCCGACAGAA/TGGTGCTCTCGTGCAGATTT。分别扩增 Mat1-1 和 Mat1-2 基因,目的片段大小分别为 412 bp 和 291 bp,可用于梯棱羊肚菌、七妹羊肚菌、六妹羊肚菌和 *Mel-21* 交配型基因的检测。

2)PCR 扩增。PCR 反应体系同前文菌株身份识别方法中的 PCR 体系,或采用如下体系:PCR MIX 1×(包含 dNTPs、Mg<sup>2+</sup>),引物各 0.25 μmol/L,模板 DNA50 ng。反应条件为:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 30 s,34 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。

3)电泳检测和结果判断。PCR 扩增产物采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测,记录扩增条带的有无和大小,若 Mat1-1-1 和 Mat1-2-1 片段大小正确且同时存在,则视为该菌株具有完整的基因型,否则视为某一种交配型缺失的菌株。

### 3 羊肚菌菌株老化和活力测定

#### 3.1 羊肚菌菌株老化表现及菌株活力测定的必要性

相对于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和丝状子囊菌鹅粪柄孢壳菌(*Podospora anserina*)<sup>[35-37]</sup>,羊肚菌老化的相关研究较落后。笔者对高羊肚菌、六妹羊肚菌、七妹羊肚菌和梯棱羊肚菌的老化进行研究<sup>[12-13,38]</sup>发现,菌株老化是羊肚菌的普遍现象,但存在菌株特异性,多数菌株连续继代培养 20~30 次(120 d 以上)后,会表现出不可逆的老化死亡;但也存在极端情况,少数菌株连续继代培养超过 50 次仍不死亡,也有少数菌株继代培养 5 次以内即发生老化死亡<sup>[38]</sup>。有研究<sup>[13]</sup>发现,随着老化程度的加剧,菌株的脂质过氧化程度增强,菌核产生能力下降,色素形成严重,栽培产量持续下降,即老化菌株不可用于实际生产。羊肚菌老化菌株的整体表现一

致:菌丝细弱,色素增强,线性生长速度下降,菌落边缘不整齐;二级菌丝和主菌丝之间的夹角增大,菌核产生能力丧失,最终彻底死亡。羊肚菌菌株老化在麦粒-木屑-土壤栽培种培养基连续传代培养时也会发生,在营养丰富的纯麦粒培养基上培养时表现更为突出<sup>[12,38-40]</sup>。老化程度与菌丝多次传代培养、不当的菌株培养和保存条件、营养环境不匹配等有关<sup>[37]</sup>。虽然缺乏深入和系统研究,但目前的研究<sup>[38-40]</sup>表明羊肚菌菌株的老化机制与线粒体的活性密切相关。由于羊肚菌老化具有菌株依赖性,存在继代培养数次即发生老化死亡的极端组织分离物,因此为避免易老化菌株用于生产带来的严重产量损失,有必要对潜在生产菌株进行活力测定。

#### 3.2 羊肚菌菌株活力测定方法

目前,羊肚菌菌株活力评价的主要依据是培养特征。继代培养是综合评价羊肚菌菌株老化简便、可靠的方法,能直观反映初始菌株的寿命(总继代培养时长和总生长距离)和活性状态(菌丝长速、菌核、色素产生等)。

**3.2.1 菌株继代培养和培养特征观察** 主要有如下几方面。

1)培养基。CYM 固体培养基。

2)大培养皿制作。将直径为 15 cm 的大培养皿灭菌后,倾注 40 mL CYM 固体培养基,凝固备用。

3)接种与培养。在培养皿一侧距边缘 1.5 cm 处接种初始菌株菌丝块,于 23 °C 避光培养,每 2 d 在菌落前端划线,记录生长距离;当菌落生长至距培养皿另一侧约 1 cm 处时,用接种钩或解剖刀取菌丝前端 0.3 cm × 0.5 cm 菌丝块,按照菌丝生长方向置于新培养皿一侧继续第二轮培养,如此循环往复,直至菌丝生长速度明显下降或停止生长。每次转接时保存一份斜面培养物用于后期形态观察。以时间(h)为横坐标,菌丝线性生长速度(mm/h)为纵坐标,绘制菌株的菌丝生长曲线,计算菌株的总生长时长和总生长距离。

4)菌落形态和菌丝微观特征观察。将保存的不同世代菌株活化培养后接种于直径 9 cm、铺有无菌玻璃纸的 CYM 培养皿中央,于 23 °C 避光培养,记录菌丝块萌发时间,采用十字划线法测量菌丝生长

速度;培养3 d、7 d和14 d后分别记录菌落形态、菌落边缘整齐度、菌核数量、菌核形态、菌落颜色等培养特征;在培养3 d时使用体视显微镜直接观察菌落前端菌丝的整齐程度,测量主菌丝与次菌丝分枝间的夹角。

**3.2.2 菌株试验性栽培** 与常规食用菌不同,羊肚菌具有快速变异和老化的特性。在羊肚菌育种和菌株保藏技术完善前,对潜在生产菌株进行小规模试验性栽培是菌株活力评判的有效手段。试验性栽培多在规模化生产前进行,一般在温控房、现代化菇房或高海拔低温地区采用常规大田栽培、塑料盘或床架栽培方式进行,每个菌株栽培面积不小于 $3\text{ m}^2$ ,且至少进行3次随机小区重复。试验性栽培技术和管理要求同规模化栽培,即环境最高温度低于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,光线可控,水分管理措施到位。观察和记录不同试验菌株的菌种萌发时间、菌丝蔓延情况、菌霜产生量、外源营养袋分解利用情况、抗杂能力、产生原基情况、原基分化程度、病虫害发生情况等,比较各栽培菌株的综合表现,挑选综合表现理想的菌株用于规模化生产。

**3.2.3 健壮菌株的判别** 根据继代培养和不同世代菌株的人工培养特征,健壮菌株的判别标准如下。

1) 菌丝块萌发早、菌丝生长速度快。菌丝块一般在接种后6 h左右萌发;不同菌株的生长速度略有差异, $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养的菌株平均线性生长速度为 $0.5\sim 0.7\text{ mm/h}$ 。

2) 菌丝长势。菌落边缘整齐,长势强劲,有齐头并进之势。

3) 菌核产生。菌核产生均匀,初期为白色,培养14 d为轻微黄棕色;不产生菌核的菌株不宜用于规模化生产<sup>[41]</sup>。

4) 色素产生。菌落色素较轻或无色;色素产生时间早且量大的菌株,老化程度较高,不宜用于生产。

5) 菌丝微观形态。主菌丝和二级菌丝分枝间的夹角小于 $30^{\circ}$ 。

6) 总继代培养时间。总继代培养时间大于100 d。

7) 试验性栽培。菌种萌发快,在土壤中蔓延快,适度产生菌霜,外源营养袋分解利用彻底,抗杂

能力强,能形成大量羊肚菌原基,部分原基有分化为幼菇的趋势,对病虫害抗性强。

## 4 实际应用效果分析

应用该评价系统对2019—2020年产季6000余亩羊肚菌栽培菌株进行了筛选和评估,结果显示评估合格的菌株扩大培养获得的原种和栽培种的质量明显提升,大田栽培67.6%的面积亩产超过 $150\text{ kg}$ (鲜菇,下同),92%的面积亩产超过 $100\text{ kg}$ ,只有小于2%的面积被判定为因菌种原因导致亩产不足 $50\text{ kg}$ 。该评价体系在2020—2021年产季应用表现更加突出,大面积(约60%)亩产大于 $200\text{ kg}$ 。与行业70%亏损的现状相比,羊肚菌生产菌株栽培适宜性IMV评价系统的应用效果明显,值得进一步推广应用。

## 5 结论与展望

使用优质生产菌株是羊肚菌栽培成功的关键。由于不同品种羊肚菌的生态习性不同,目前只有少数羊肚菌被成功驯化栽培。因此,在规模化生产推广应用前,应采用ITS序列分析技术确定栽培菌株的分类地位,以确定是否属于目前大规模推广应用的种类(如梯棱羊肚菌、六妹羊肚菌和七妹羊肚菌),不要盲目推广应用分类地位不明确的羊肚菌菌株。目前人工栽培的多数羊肚菌属于异宗结合生活史类型,需要两种不同交配型基因的细胞核共存才能完成完整的生活史。单孢分离物只包含1种交配型,且和多孢分离物一样都存在性状分离现象,可作为育种材料但不宜直接用于生产。获得羊肚菌生产菌株还要以组织分离法为主。由于羊肚菌组织分离物存在一定比例的交配型丢失,因此要测定生产菌株的交配型,确保两种交配型共存的菌株用于规模化生产。羊肚菌菌株老化现象较突出,多数菌株在较短时间连续继代培养即可发生不可逆的老化死亡,甚至存在继代培养数代即老化死亡的极端组织分离物,因此有必要对拟推广应用的羊肚菌菌株进行继代培养试验,选择不易老化和老化程度较弱的高活力菌株用于生产。本文基于多年的羊肚菌生物学研究和实际生产经验,提出了羊肚菌生产菌株栽培适宜性IMV评价系统,涉及菌株身份识别、交配

型基因检测、菌株活力测定等多项评价内容,在实际生产中应用表现理想,值得进一步推广应用。今后应强化羊肚菌老化检测技术及老化分子机制研究,加强羊肚菌优质品种选育,规范和推广菌株栽培适宜性评价技术应用,以显著提升羊肚菌人工栽培的稳定性,促进我国羊肚菌产业更好发展。

#### 参考文献:

- [1] 何培新,刘伟,郝哲,等.彩图版羊肚菌实用栽培技术[M].北京:中国农业出版社,2020.
- [2] 谭方河.羊肚菌人工栽培技术的历史、现状及前景[J].食药菌,2016,24(3):140-144.
- [3] OWER R D. Notes on the development of the morel ascocarp[J]. Mycologia, 1982, 74: 142.
- [4] 刘伟,蔡英丽,张亚,等.我国羊肚菌人工栽培快速发展的关键技术解析[J].食药菌,2018,26(3):142-147.
- [5] 刘伟,张亚,蔡英丽.我国羊肚菌产业发展的现状及趋势[J].食药菌,2017,25(2):77-83.
- [6] 刘伟,蔡英丽,何培新,等.羊肚菌栽培的病虫害发生规律及防控措施[J].食用菌学报,2019,26(2):128-134.
- [7] 赵永昌,柴红梅,陈卫民.理性认识羊肚菌产业发展诸多问题[J].食药菌,2018,26(3):121-127.
- [8] 赵永昌,柴红梅,张小雷.我国羊肚菌产业化的困境和前景[J].食药菌,2016,24(3):133-139,154.
- [9] 何培新,刘伟,蔡英丽,等.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[J].郑州轻工业学院学报(自然科学版),2015,30(3):26-29.
- [10] 王波,鲜灵.人工栽培羊肚菌的鉴定[J].西南农业学报,2013,26(5):1988-1991.
- [11] 刘伟,蔡英丽,何培新,等.羊肚菌组织分离物交配型基因缺失现象分析[J].食用菌学报,2020,27(3):1-6.
- [12] HE P X, CAI Y L, LIU S M, et al. Morphological and ultrastructural examination of senescence in *Morchella elata* [J]. Micron, 2015, 78: 79-84.
- [13] HE P X, YU M, CAI Y L, et al. Effect of ageing on culture and cultivation of the culinary-medicinal mushrooms, *Morchella importuna* and *M. sextelata* (Ascomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2019, 21(12): 1089-1098.
- [14] 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):183-197.
- [15] TASKIN H, BUYUKALACA S, DOGAN H H, et al. A multigene molecular phylogenetic assessment of true morels (*Morchella*) in Turkey [J]. Fungal Genetics & Biology, 2010, 47(8): 672-682.
- [16] 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 & Biology, 2011, 48(3): 252-265.
- [17] TASKIN H, BUYUKALACA 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): 446-461.
- [18] DU X H, ZHAO Q, O'DONNELL K, et al. Multi-gene molecular phylogenetics reveals true morels (*Morchella*) are especially species-rich in China [J]. Fungal Genetics & Biology, 2012, 49(6): 455-469.
- [19] DU X H, WU D M, HE G Q, et al. Six new species and two new records of *Morchella* in China using phylogenetic and morphological analyses [J]. Mycologia, 2019, 111(5): 857-870.
- [20] 蔡英丽,马晓龙,路等学,等.野生羊肚菌 *Mel-21* 的系统发育学分析和驯化[J].食用菌学报,2020,27(3):23-29.
- [21] PILZ D, REBECCA M L, SUSAN A, et al. Ecol-

- ogy and management of morels harvested from the forests of Western North America [R]. USA: Pacific Northwest Research Station, 2007.
- [22] MASAPHY S. External ultrastructure of fruit body initiation in *Morchella* [J]. Mycological Research, 2005, 109(4): 508-512.
- [23] MASAPHY S. Biotechnology of morel mushrooms: Successful fruiting body formation and development in a soilless system [J]. Biotechnological Letters, 2010, 32(10): 1523-1527.
- [24] 杜习慧. 黑色羊肚菌支系的物种资源、生殖模式和遗传多样性研究进展 [J]. 菌物研究, 2019, 17(4): 240-251.
- [25] VOLK T J, LEONARD T J. Cytology of the life-cycle of *Morchella* [J]. Mycological Research, 1990, 94(3): 399.
- [26] 刘伟, 蔡英丽, 何培新, 等. 梯棱羊肚菌单孢及杂交群体的栽培出菇试验和极性分析 [J]. 菌物研究, 2019, 17(1): 43-49.
- [27] CHAI H M, CHEN W M, ZHANG X L, et al. Structural variation and phylogenetic analysis of the mating-type locus in the genus *Morchella* [J]. Mycologia, 2019, 111(4): 551-562.
- [28] CHAI H M, CHEN L J, CHEN W M, et al. Characterization of mating-type idiomorphs suggests that *Morchella importuna*, *Mel-20* and *M. sextelata* are heterothallic [J]. Mycological Progress, 2017, 16(7): 743-752.
- [29] DU X H, ZHAO Q, XIA E H, et al. Mixed-reproductive strategies, competitive mating-type distribution and life cycle of fourteen black morel species [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 1493.
- [30] HE P X, WANG K, CAI Y L, et al. Live cell confocal laser imaging studies on the nuclear behavior during meiosis and ascosporegenesis in *Morchella importuna* under artificial cultivation [J]. Micron, 2017, 101: 108-113.
- [31] LIU W, CAI Y L, ZHANG Q Q, et al. Subchromosome-scale nuclear and complete mitochondrial genome characteristics of *Morchella crasipes* [J]. International Journal of Molecular Science, 2020, 21(2): 483.
- [32] LIU W, CHEN L F, CAI Y L, et al. Opposite polarity monospore genome de novo sequencing and comparative analysis reveal the possible heterothallic life cycle of *Morchella importuna* [J]. International Journal of Molecular Science, 2018, 19(9): 2525.
- [33] 刘萍, 马渊浩, 赵永昌, 等. 羊肚菌单孢菌株的性亲和与营养体亲和特性 [J]. 食用菌学报, 2021, 28(1): 40-47.
- [34] 汪虹, 魏静, 林楠, 等. 交配型基因作为分子标记鉴定蛹虫草退化菌株的核相初步研究 [J]. 食用菌学报, 2010, 17(4): 1-4.
- [35] OSIEWACZ H D. Aging in fungi: Role of mitochondria in *Podospora anserina* [J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2002, 123(7): 755-746.
- [36] XIANG X, FISCHER R. Nuclear migration and positioning in filamentous fungi [J]. Fungal Genetics & Biology, 2004, 41(4): 411-419.
- [37] OSIEWACZ H D. Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi [J]. Ageing Research Reviews, 2002, 1(3): 425-442.
- [38] 刘伟, 何培新, 蔡英丽, 等. 羊肚菌衰老特性的测定分析 [J]. 食药用菌, 2021, 29(1): 44-49.
- [39] 张杰雄. 羊肚菌发育衰老机制研究 [D]. 西安: 西北工业大学, 2021.
- [40] 刘璐, 邓百万, 兰阿峰, 等. 羊肚菌菌种退化机理研究 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41(10): 57-61.
- [41] 刘奇正, 董彩虹. 羊肚菌菌核的形成研究进展及其在栽培中应用的探讨 [J]. 食用菌学报, 2020, 27(4): 172-178.

## Evaluation system of cultivating suitability for the productive strains of *Morchella* mushrooms

LIU Wei<sup>1</sup>, CAI Yingli<sup>2</sup>, MA Xiaolong<sup>2</sup>, HE Peixin<sup>3</sup>

1. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China;

2. Institute of Vegetable, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430345, China;

3. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

**Abstract:** *Morchella* mushrooms are edible and medicinal mushrooms appreciated worldwide. Since 2012, the scale of morel artificial cultivation has been increasing year after year in China. However, the instability of morel cultivation has been frustrating morel farming. The industrial instability may be closely related to the imperfection of strain evaluation system of cultivating suitability and the resulted implication of poor quality and unstable spawns in practical cultivation. Compared with most mushrooms belonging to Basidiomycota, the ascomycetes of morels own special characteristics in species diversity, deletion of mating type genes, and rapid strain aging, which put forward special request for systematic detection of relevant characteristics in cultivated strains. Based on long-term fundamental research and practical experiences, an IMV evaluation system of cultivating suitability for productive strains of *Morchella* mushrooms, including identity recognition, detection of mating types and assay of vitality, was proposed in this paper. The technological necessity and the detailed procedure were sorted out. Given the application of the evaluation system in field cultivation in two seasons, the potential morel productive strains may be scientifically and systematically screened and assessed to confirm the use of suitable strains in cultivation, which will strengthen the stability of morel cultivation, and thus promote the sustainable and stable development of morel industry.

**Key words:** *Morchella* mushrooms; strain identification; mating-type gene; strain aging; IMV evaluation system

(责任编辑:杨晓娟)

(上接第 49 页)

## Enzymatic modification of wheat bran and its effect on flour farinograph properties and dough extensograph properties

GUO Yanyan, LI Hua, ZHU Xuanxuan

College of Food Science and Technology, He'nan University of Technology, Zhengzhou 450000, China

**Abstract:** The wheat bran was passed through an 80-mesh sieve, and it was modified enzymatically with cellulase. The modification process conditions were optimized through single factor test and orthogonal test. The modified wheat bran was added to the flour and the farinographical property of the flour and the extensographical properties of the dough were explored. The results showed that the optimal process conditions for the enzymatic modification of wheat bran were cellulase addition 1.0%, reaction temperature 65 °C, reaction time 4.0 h, and pH value 4.0. Under these conditions, the extraction rate of SDF was 12.59%. With the increase of modified wheat bran addition, the water absorption rate of the flour increased, the dough formation time and weakening degree increased slowly, the stabilization time, extensibility and tensile area of the dough decreased, and the tensile resistance and tensile ratio showed a trend of first increasing and then decreasing. After waking 90 and 135 min, the tensile resistance and tensile ratio of the dough increased with the addition of modified wheat bran, reaching the highest values at 4% and 8%, respectively.

**Key words:** wheat bran modification; dietary fiber; cellulase; farinograph property; extensograph property

(责任编辑:杨晓娟)