

## 采自山东的几株野生羊肚菌鉴定\*

赵建俊<sup>1</sup>, 吉建成<sup>1</sup>, 于国民<sup>2</sup>, 董相军<sup>3</sup>, 徐丽丽<sup>1\*\*</sup>

(1.青岛农业大学, 山东 青岛 266109; 2.内蒙古自治区克什克腾旗桦木沟林场, 内蒙古 赤峰 025366;

3.内蒙古自治区克什克腾旗林业局, 内蒙古 赤峰 025378)

**摘要:** 将山东地区采集的7株野生羊肚菌菌株, 采用传统形态学分析, 结合ITS, *efl- $\alpha$* , *rpb1* 序列比对方法, 对获得的7株试验菌株进行分子鉴定和系统发育分析。Blast 比对结果显示, 编号为Me25、Me27、M51的菌株与宽圆羊肚菌 (*Morchella robusta*) 相似性超过99%, Me30与羊肚菌 (*Morchella esculenta*) 相似性超过99%, Me91与Mes-19 (*Morchella* sp.) 相似性超过99%, Me1-2和Me4-1与小海绵羊肚菌 (*Morchella spongiosa*) 相似性超过99%。系统发育分析也发现聚类情况与Blast结果相对应。结合传统形态学特性观察及分子系统发育分析, 确定编号Me25、Me27、M51为宽圆羊肚菌, Me30为羊肚菌, Me1-2和Me4-1为小海绵羊肚菌, Me91为*Morchella* sp.。本研究为羊肚菌属真菌的分类鉴定提供了更为简单精确的方法, 补充了山东省内野生羊肚菌资源, 有利于北方羊肚菌育种工作。

**关键词:** 羊肚菌; ITS; *efl- $\alpha$* 、*rpb1* 序列分析; Blast; 菌种鉴定; 系统发育

**中图分类号:** S646.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-8310(2020)12-0028-05

## Identification of Several Strains of Wild *Morchella* spp. in Shandong Province

ZHAO Jian-jun<sup>1</sup>, JI Jian-cheng<sup>1</sup>, YU Guo-min<sup>2</sup>, DONG Xiang-jun<sup>3</sup>, XU Li-li<sup>1</sup>

(1.Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2.Huamugou Forest Farm, Keshikten Banner, Inner Mongolia Autonomous region, Chifeng 025366, China;

3.Keshikten Banner Forestry Bureau of Inner Mongolia Autonomous region, Chifeng 025378, China)

**Abstract:** Seven strains of wild *Morchella* spp. collected from Shandong area were identified by molecular identification and phylogenetic analysis by traditional morphological analysis combined with ITS, *efl- $\alpha$*  and *rpb1* sequence alignment techniques. The results of Blast comparison showed that the similarity between strains numbered Me25, Me27, Me51 and *M. robusta* was more than 99%, the similarity between Me30 and *M. esculenta* was more than 99%, the similarity between Me91 and Mes-19 (*Morchella* sp.) was more than 99%, the similarity between Me1-2, Me4-1 and *M. spongiosa* is more than 99%. Phylogenetic analysis also found that clustering was consistent with Blast results. Combined with traditional morphological observation and molecular phylogenetic analysis, Me25, Me27, M51 were identified as *M. robusta*, Me30 was identified as *M. esculenta*, Me1-2 and Me4-1 were *M. Spongiosa*, and Me91 was identified as *Morchella* sp. This study provided a more simple and accurate method for the identification of *Morchella* spp., supplemented the wild *Morchella* resources in Shandong Province, and was beneficial to the breeding of *Morchella* spp. in North China.

**Key words:** *Morchella* spp.; ITS, *efl- $\alpha$* , *rpb1* sequence analysis; Blast; strain identification; phylogenetic

羊肚菌 (*Morchella* spp.) 又称羊肚子、羊肚蘑、羊肚菜、蜂窝蛾子等, 属于子囊菌亚门 (Ascomycota) 盘菌纲 (Pezizomycetes) 盘菌目 (Pezizales) 羊

肚菌科 (Morchellaceae)<sup>[1]</sup>, 其属模式菌株是羊肚菌 *Morchella esculenta* (L.) Pers.。《本草纲目》中对羊肚菌有“甘寒无毒, 益肠胃, 化痰利气”的描述; 北

\* 基金项目: 2018 年国家重点研发计划资助项目 (2018YFD0400200); 2018 年山东省农业重大应用技术创新项目 (纵 20190019)。

作者简介: 赵建俊 (1993-), 男, 在读硕士研究生, 主要研究方向为食用菌方面。E-mail: 1176688504@qq.com

\*\* 通信作者: 徐丽丽 (1979-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事食用菌方面研究。E-mail: ellyxu@163.com

收稿日期: 2020 - 11 - 09

美地区普遍认为羊肚菌是最佳食用菌; 在欧洲许多国家对其喜爱程度仅次于块菌 (*Tuber* sp.)<sup>[2]</sup>。羊肚菌子实体肉质鲜美, 香脆可口, 含有丰富的蛋白质、维生素、氨基酸和多糖等有效成分<sup>[3]</sup>, 有较强的抗肿瘤, 抗氧化, 增强免疫力的作用, 可减轻癌症患者放疗引起的不良反应<sup>[4]</sup>。其内还含有一种羊肚菌独有的特殊的香味物质, 即脯氨酸类似物, 被广泛应用于调味品和食品添加剂领域<sup>[5]</sup>。因此, 羊肚菌在食品、药用、保健品、化妆品等领域有广阔的应用前景。

生长环境及气候等因素的变化, 可能会导致羊肚菌的形态特征发生很大改变, 甚至同一物种不同发育阶段的形态也会有较大差异。传统的形态学分类造成了该属普遍存在同名异物和同物异名现象<sup>[2]</sup>。核糖体 rDNA 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列分析技术, 因其快速, 准确, 简便而被广泛应用于真菌的分子鉴定和系统发育分析中<sup>[6-7]</sup>。然而杜习慧等<sup>[8]</sup>发现基因库 (GenBank) 中约 66% 的羊肚菌 ITS 序列均被贴上了错误的物种名称标签。基于荷兰皇家艺术与科学研究院真菌培养中心 (CBS - KNAW) 网站, 由包括我国在内的 5 个单位合作共同构建了一个网络数据库, 即羊肚菌多基因序列模标数据库 *Morchella* MLST (multilocus sequence typing, <http://www.cbs.knaw.nl/morchella/>)<sup>[9]</sup>。该数据库中收录了大量准确鉴定的羊肚菌分子信息。随着羊肚菌系统发育学研究的深入, 羊肚菌属内不同种的 ITS 序列一般只有几个碱基的差距, 仅依靠 ITS 序列已不能准确鉴定羊肚菌的种属关系, 并且从形态上进行不同种的分类也很困难, 而多基因系谱一致性系统发育种识别法 (genealogical concordance phylogenetic species recognition, GCPSR) 作为一种更完备的方法在近年来被广泛应用。因此, 鉴定采用 ITS、*rpb1* 和 *efl-α* 联合矩阵序列分析技术, 对收集到的 7 株羊肚菌菌株进行分子鉴定和系统发育分析, 以期为其人工栽培和菌种选育提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌株

于山东省潍坊市采集到野生羊肚菌 6 株, 由羊肚菌子实体组织分离培养获得菌丝, 编号分别为

Me25、Me27、Me30、M51、Me4-1 和 Me1-2; 于山东省临沂市采集野生羊肚菌 1 株, 编号为 Me91。

#### 1.1.2 药品和试剂

分析纯试剂葡萄糖、琼脂、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $KH_2PO_4$ 、异丙醇、无水乙醇, 柱式试剂盒 E.Z.N.A.™ Fungal DNA Mini Kit 等均购于生工生物工程股份有限公司。

#### 1.1.3 试验仪器

SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; PC214 电子天平, OHOUS 仪器有限公司; 电热恒温培养箱, 上海福玛实验设备有限公司; PCR 仪, 大龙医疗设备有限公司。

#### 1.1.4 供试培养基

CPDA 培养基: 马铃薯 20%、葡萄糖 2%、琼脂 2%、 $KH_2PO_4$  1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%, pH 自然。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 传统形态学鉴定

供试菌株样品参照《大型真菌图鉴》, 按照子实体性状、大小和颜色等特征进行初步鉴定, 并结合菌丝形态和菌核特性等微观特征, 进行传统形态学分类鉴定<sup>[10]</sup>。

### 1.2.2 分子鉴定

#### 1) 菌丝体 DNA 提取

采用 Ezup 柱式真菌 DNA 抽提试剂盒提取 DNA, 具体步骤详见试剂盒说明书。

#### 2) 样品 rDNA ITS、*rpb1* 和 *efl-α* 序列 PCR 扩增 样品 PCR 扩增和测序引物见表 1。

表 1 PCR 和测序引物

Tab.1 PCR and sequencing primers

位点	引物	序列 (5'-3')	分类单元
<i>rpb1</i>	RPB1Y-F	CGATCTATTAGAACATGGGGCTTC	黄色羊肚菌支系
	RPB1Y-R	GTTGACAACGTGAGCTGGAGA	
<i>efl-α</i>	EF-595F	CGTGACTTCATCAAGAACATG	所有羊肚菌支系
	EF-1R	GGARGGAAYCATCTTGACGA	
ITS-rDNA	ITS1	TCCGTAGTGTAACCTGCCG	所有羊肚菌支系
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

PCR 扩增采用 50 μL 体系, 其中 2×Taq PCR Master Mix 25 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 的引物各 2 μL, DNA 模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 补齐至 50 μL; ITS 序列 PCR 反应程序为 94℃ 变性 4 min, 94℃ 变性 1 min,

57℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 完成 35 个循环, 72℃延伸 10 min。*efl-α* 和 *rpb1* 的 PCR 反应程序为 94℃初始变性 3 min, 94℃变性 1 min, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 完成 35 个循环, 72℃最终延伸 10 min<sup>[11]</sup>。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 电压为 100 V, 产物和 Marker 上样量均为 5 μL, 电泳结果于 BioDoc-It UVP 凝胶成像系统成像。

### 3) 扩增产物的序列测定

将 1.2.2 中得到的样品 ITS、*rpb1* 和 *efl-α* 序列扩增产物直接送至上海生工公司测序。

### 4) 扩增产物序列对比及分析

将测序得到的序列, 通过 NCBI 在线 Blast, 与 GenBank 中已被测序成功的羊肚菌序列进行同源性比对。相关序列从 *Morchella* MLST 数据库下载。采用 MEGA 5.0 软件 Neighbor-joining 聚类分析方法构建系统发育树, 后用 Maximum-parsimony 法构建联合矩阵系统发育树, 并进行聚类分析<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品子实体形态学鉴定

样品子实体参照《大型真菌图鉴》<sup>[10]</sup>, 按照子实体大小、颜色和形状等分析, 样品形态特征见图 1。

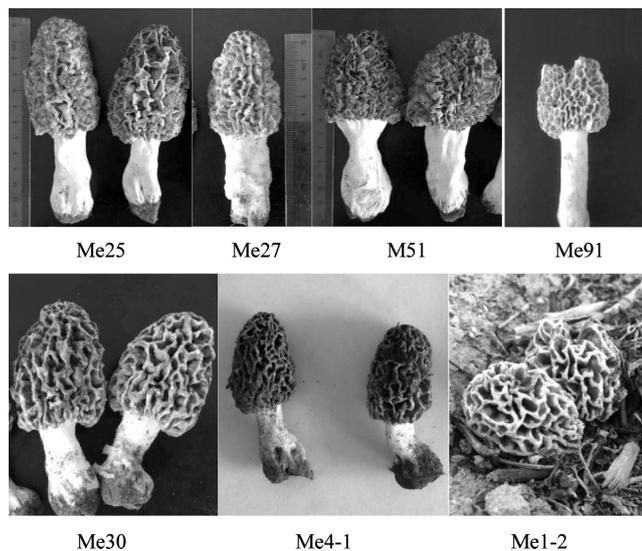


图 1 不同形态的羊肚菌子实体

Fig.1 *Morchella* spp. with different morphological characteristics

由图 1 可知, Me25 子实体较大, 颜色土黄, 高 12 cm~14 cm, 其中菌帽长 7 cm~8 cm, 表面有不规则凹坑; 菌柄长 5 cm~6 cm, 污白色, 表面光滑。Me27 子实体较大, 颜色浅土黄, 高 10 cm~12 cm,

菌帽表面凹坑不规则, 凹坑间的脊厚; 菌柄 5 cm~6 cm, 粗壮, 污白色, 柄基部不膨大。M51 子实体较大, 颜色灰褐色, 高 13 cm~15 cm, 其中菌帽长 6 cm~7 cm, 表面凹坑不规则, 脊厚; 菌柄长 7 cm~8 cm, 白色, 表面有细小颗粒, 菌柄基部稍膨大。Me91 子实体中等大小, 颜色土黄, 高 12 cm~13 cm, 菌帽钝圆, 表面有不规则凹坑, 菌柄长, 表面不光滑。Me30 子实体较小, 高约 4 cm~6 cm, 菌帽顶部钝圆, 浅灰褐色, 表面凹坑不规则, 脊厚而脆, 菌柄污白色, 空心, 偶有基部膨大。Me4-1 子实体小, 高约 2 cm~4 cm, 浅灰褐色, 顶部钝圆。Me1-2 子实体小, 高约 2 cm~4 cm, 土黄色, 顶部钝圆, 生于火烧地上。

### 2.2 样品 ITS、*rpb1* 和 *efl-α* 序列的 PCR 扩增及测序分析

试验样品的各位点片段经 PCR 扩增的产物进行凝胶电泳, 各片段大小见图 2。

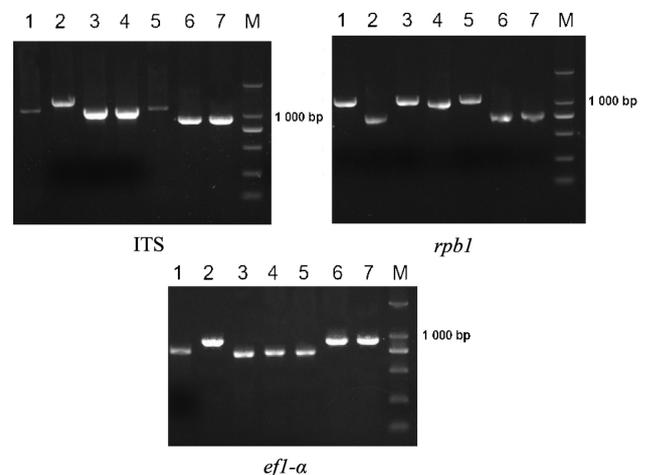


图 2 羊肚菌基因序列的扩增结果

Fig.2 The result of amplification of genomic ITS, *rpb1* and *efl-α* sequences of *Morchella* spp.

注: 序号 1~7 分别表示菌株 Me27、Me51、Me30、Me91、Me25、Me4-1、Me1-2。

Note: Numbers 1~7 denote the strains Me27, Me51, Me30, Me91, Me25, Me4-1, Me1-2, respectively.

将获得序列通过 NCBI 在线 Blast 对比, 与 GenBank 中已被测序成功的羊肚菌序列进行同源性比对, 相似性超过 99% 的物种名称统计结果见表 2。

### 2.3 系统发育分析

采用 MEGA 7.0 对样品序列进行排列, 采用 ITS、*rpb1*、*efl-α* 序列联合矩阵分析构建系统发育树, 结果见图 3。

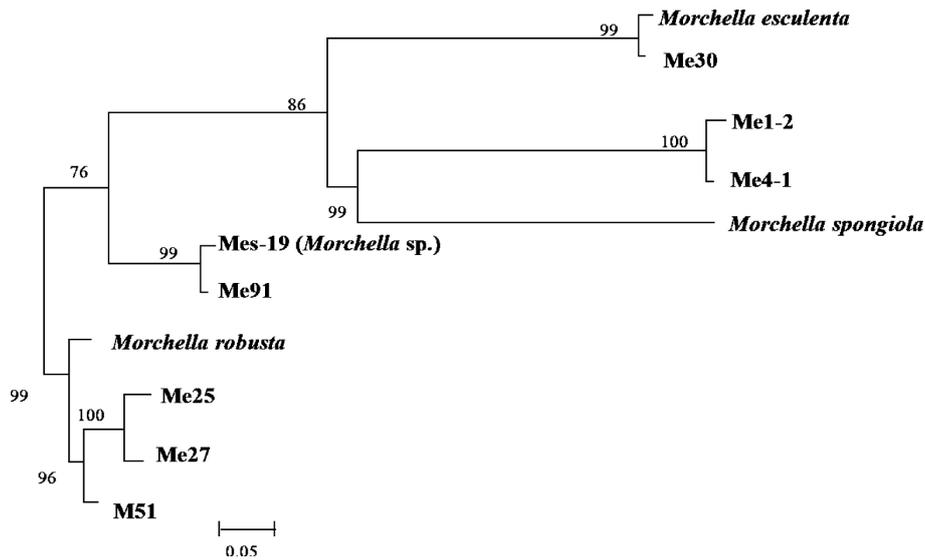


图 3 基于 ITS、rpb1、ef1-α 序列联合矩阵的羊肚菌系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of *Morchella* spp. inferred from the most parsimony analysis based on ITS, *rpb1* and *ef1-α* dataset

表 2 羊肚菌 ITS、rpb1 和 ef1-α 区序列测序结果

Tab.2 Sequencing results of *Morchella* spp. ITS、*rpb1* and *ef1-α* fragment

品种	位点	序列 (5'-3')	大小/bp	种名
Me27	ITS	1 152		宽圆羊肚菌 <i>Morchella robusta</i>
	<i>rpb1</i>	981		
	<i>ef1-α</i>	734		
M51	ITS	1 202		宽圆羊肚菌 <i>Morchella robusta</i>
	<i>rpb1</i>	721		
	<i>ef1-α</i>	898		
Me30	ITS	1 069		羊肚菌 <i>Morchella esculenta</i>
	<i>rpb1</i>	988		
	<i>ef1-α</i>	703		
Me91	ITS	1 011		羊肚菌属 Mes-19 ( <i>Morchella</i> sp.)
	<i>rpb1</i>	961		
	<i>ef1-α</i>	720		
Me25	ITS	1 170		宽圆羊肚菌 <i>Morchella robusta</i>
	<i>rpb1</i>	979		
	<i>ef1-α</i>	728		
Me4-1	ITS	902		小海绵羊肚菌 <i>Morchella spongiola</i>
	<i>rpb1</i>	723		
	<i>ef1-α</i>	899		
Me1-2	ITS	900		小海绵羊肚菌 <i>Morchella spongiola</i>
	<i>rpb1</i>	726		
	<i>ef1-α</i>	899		

由图 3 可以看出，供试菌株 Me25、Me27、Me51 与宽圆羊肚菌 *Morchella robusta* 亲缘关系较近，Me30 与羊肚菌 *Morchella esculenta* 亲缘关系较近，Me91 与 *Morchella* sp. Mes-19 亲缘关系很近，Me1-2 和 Me4-1 与小海绵羊肚菌 *Morchella spongiola* 亲缘关系很近。

### 3 讨论与结论

由于环境气候等外界条件和个体发育的改变，羊肚菌子实体的形状、大小等形态特征会发生较大变化，单一的传统形态学分类很难对其进行准确的分类鉴定。采用常规传统形态学鉴定，并结合 ITS、*rpb1*、*ef1-α* 序列联合矩阵分析，将得到的 7 株羊肚菌样品进行分类鉴定，确定供试菌株 Me25、Me27、Me51 为宽圆羊肚菌，Me30 为羊肚菌，Me91 为羊肚菌属某种，Me1-2 和 Me4-1 为小海绵羊肚菌。

分子生物学结合系统发育学的研究，在真菌的分类鉴定中起到了主要作用<sup>[13]</sup>。rDNA 的 ITS、*rpb1*、*ef1-α* 序列测定及限制性片段长度多态性聚合酶链式反应 (PCR RFLP) 技术等方法<sup>[14]</sup>的应用，成为了羊肚菌属分类鉴定和系统发育分析的有效手段。Taylor 等<sup>[15]</sup>提出了多基因谱系一致性系统发育物种识别法，即通过比对 DNA 核酸序列，进行系统发育分析，比较拓扑学关系，从而界定物种。该方法近年来逐渐被广泛应用，解决了分类学上的诸多问题，为羊肚菌的分类研究提供了新的思路。

## 参考文献:

- [1] Hibbett D, Binder M, Bischoff JF, et al. A higher-level phylogenetic classification of the fungi [J]. *Mycological Research*, 2007, 111 (5) : 509-547.
- [2] 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.
- [3] 林晓民, 王少先, 侯军. 中国大型真菌的多样性[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [4] 孙晓明, 张卫明, 吴素玲. 羊肚菌免疫调节作用研究[J]. *中国野生植物资源*, 2001, 20 (1) : 12-13.
- [5] 袁明生, 孙佩琼. 四川蕈菌[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1995.
- [6] Ohyanagi H, Ikeo K, Gojobori T. Eukaryotic nuclear structure explains the evolutionary rate difference of ribosome export factors[J]. *Gene*, 2008, 421 (1-2) : 7-13.
- [7] 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.
- [8] 杜习慧. 羊肚菌属的分子系统学和生物地理学研究—兼论该属两个物种的群体遗传学[D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2012.
- [9] Du XH, Zhao Q, Yang ZL, et al. *Morchella* ITS rDNA phylogenetics—How well do ITS rDNA sequences differentiate species of true morels (*Morchella*)? [J]. *Mycologia*, 2012, 104 (6) : 1351-1368.
- [10] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000: 560-569.
- [11] 桂明英, 何容, 郭永红, 等. 基于形态特征和 ITS 序列对新疆芦苇根蘑菇的分类鉴定[J]. *食用菌*, 2014, (4) : 14-16.
- [12] Bunyard BA. A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene [J]. *Mycologia*, 1994, 86 (6) : 762.
- [13] 杨祝良. 基因组学时代的真菌分类学:机遇与挑战[J]. *菌物学报*, 2013, 32 (6) : 31-946 .
- [14] Wipf D, Munch JC, Botton B, et al. DNA polymorphism in morels: complete sequences of the internal transcribed spacer of genes coding for rRNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella conica* (black morel)[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1996, 62 (9) : 3541-3543.
- [15] Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 31 (1) : 21-32.

(上接第 27 页)

据报道,在华北地区的盐碱地,含盐量<0.2%为非盐渍化土壤;0.2%~0.3%为轻度盐渍化土壤;0.3%~0.4%为中度盐渍化土壤;0.4%~0.6%为重度盐渍化土壤;含盐量大于0.6%或1.0%为盐土<sup>[5]</sup>。在东营市盐碱地 pH 为 8.09~8.35,盐度在 0.3%~3.0%<sup>[14]</sup>。因此,文登菌株具有较强的耐盐能力,为盐碱地栽培羊肚菌及其育种提供了菌种资源。

## 参考文献:

- [1] 路晓筠, 项卫东, 郑光耀, 等. 盐碱地改良措施研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43 (12) : 5-8.
- [2] 张体彬, 展小云, 冯浩. 盐碱地土壤酶活性研究进展和展望[J]. *土壤通报*, 2017, 48 (2) : 495-500.
- [3] 孙巧弟, 张江萍, 谢洋洋, 等. 羊肚菌营养素、功能成分和保健功能研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40 (5) : 323-328.
- [4] 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.
- [5] 赵可夫, 李法曾. 中国盐生植物[M]. 北京: 科学出版社, 1999 (7) : 6-9.
- [6] 谢放, 吴萍民, 赵春巧. 7 株羊肚菌菌丝的生物学特性研究[J]. *中国农学通报*, 2014, 30 (10) : 140-147.
- [7] 陈易飞, 郭益红. 温度、pH 对羊肚菌菌丝体生长的影响[J]. *苏南科技开发*, 2007 (8) : 28-29.
- [8] 肖锋, 王得贤, 杨冬梅. 温度 pH 值光照对羊肚菌菌丝生长的影响[J]. *中国食用菌*, 2000, 29 (5) : 13-15.
- [9] 李洁, 张云霞, 邱德江. 不同因素对羊肚菌孢子萌发和菌丝生长的影响[J]. *河北林业科技*, 2004 (2) : 1-2.
- [10] 李小燕, 刘星. 温度和 pH 值对羊肚菌菌丝培养的影响[J]. *咸宁师专学报*, 1997 (3) : 95.
- [11] 周洁, 谭伟, 曹雪莲, 等. 羊肚菌 A1 菌株菌丝体的培养特性[J]. *中国食用菌*, 2016, 35 (4) : 12-17.
- [12] 戚繁. 美拉德反应在食品工业中的研究进展[J]. *现代食品*, 2020, 10 (19) : 44-46.
- [13] 何锦香, 马浩, 任桂梅. 陕北羊肚菌母种菌丝体生长的 pH 值试验[J]. *食用菌*, 2004 (6) : 13-14.
- [14] 王玉珍. 东营市盐碱地土壤成分及植物群落分布规律研究[J]. *安徽农业科学*, 2007 (17) : 5235.