

何培新, 刘 伟. 粗柄羊肚菌分子鉴定及羊肚菌属真菌系统发育分析[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(2): 395-399.

粗柄羊肚菌分子鉴定及羊肚菌属真菌系统发育分析

何培新, 刘 伟

(郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 鉴定河南省郑州市郊区发生的羊肚菌标本, 并分析羊肚菌属真菌的系统发育关系。采用内转录间隔区 (Internal transcribed sequence, ITS) 序列分析进行分子鉴定, 结果表明, 郑州市郊区发生的羊肚菌为粗柄羊肚菌 (*Morchella crassipes*), 与形态鉴定结果一致; 系统发育分析结果表明, 羊肚菌属真菌整体上至少可以分为 4 个类群: 第 I 类群包括高羊肚菌 (*M. elata*)、黑脉羊肚菌 (*M. angusticeps*)、肋脉羊肚菌 (*M. costata*)、尖顶羊肚菌 (*M. conica*) 和 *M. gigas* 等种类; 第 II 类群包括羊肚菌 (*M. esculenta*)、粗柄羊肚菌和小海绵羊肚菌 (*M. spongiola*) 等; 第 III 类群仅包括红褐羊肚菌 (*M. rufobrunnea*) 1 个种; 半开羊肚菌 (*M. semilibera*) 被归为第 IV 类群, 与其他类群进化距离更远。ITS 序列分析可以用于羊肚菌属种类鉴定和系统发育分析。

关键词: ITS 序列; 粗柄羊肚菌; 羊肚菌属; 系统发育

中图分类号: S567.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2010)02-0395-05

Molecular Identification of *Morchella crassipes* and Phylogenetic Analysis of *Morchella* Fungi

HE Pei-xin, LIU Wei

(School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou Institute of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To identify a morel sample collected from the suburbs of Zhengzhou, Henan Province and to study the phylogenetic relationships of fungi of genus *Morchella*, internal transcribed sequence (ITS) analysis was applied. The morel mushroom identified is *Morchella crassipes*, which is consistent with morphological identification. Phylogenetic analysis reveals all *Morchella* strains can be divided into four groups. The first group includes *M. elata*, *M. angusticeps*, *M. costata*, *M. conica* and *M. gigas*; the second group includes *M. esculenta*, *M. crassipes* and *M. spongiola*; the only species *M. rufobrunnea* belongs to the third group, and the fourth group, which also includes only one species of *M. semilibera*, has bigger distance with other groups. The sequence analysis of ITS can be used in species identification and study of phylogenetic relationships of genus *Morchella*.

Key words: internal transcribed sequence; *Morchella*; *Morchella crassipes*; phylogeny

羊肚菌 (*Morchella* spp.) 是一种珍稀的食药兼

用真菌, 市场价格昂贵。百余年来, 围绕羊肚菌的分类鉴定、生态分布、遗传生理、驯化栽培等进行了大量研究, 但仍有很多问题没有解决, 其中包括羊肚菌的分类和鉴定。羊肚菌传统分类主要以其菌盖的大小及颜色、脊脉的特征、凹陷的大小、菌柄的大小及颜色、菌盖与菌柄的着生情况、子囊、子囊孢子以及侧丝的形态特征等为主要依据^[1], 不同时期、不同学者有着不同的认识, 因而产生了一定程度的混乱:

收稿日期: 2009-07-12

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究项目 (082300430160); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCXZ-YM-N-46-02-04); 郑州轻工业学院博士科研基金项目 (000394)

作者简介: 何培新 (1970-), 男, 河南民权人, 博士, 副教授, 研究方向为真菌生物技术。

目前对羊肚菌属种的划分从3个种到28个种不等^[2],真菌学词典第十版记载羊肚菌属36种^[3]。针对这种混乱状况,Bunyard等根据羊肚菌的总体形态将其分为3个类群:黑羊肚菌[包括黑脉羊肚菌(*M. angusticeps*)、尖顶羊肚菌(*M. conica*)和高羊肚菌(*M. elata*)],黄羊肚菌[包括小羊肚菌(*M. deliciosa*)、粗柄羊肚菌(*M. crassipes*)]和半开羊肚菌(*M. semilibera*),此外,还有1个菌柄变红的类群,包括红褐羊肚菌(*M. rufobrunnea*)、危地马拉羊肚菌(*M. guatemalensis*)和硬羊肚菌(*M. rigida*)^[4]。随着分子生物学技术的发展,内转录间隔区序列(Internal transcribed sequence, ITS)分析已经普遍用于真菌属种水平的分类关系研究^[5-7],成为一种真菌分类鉴定的有效技术。本研究利用ITS序列分析技术,对1株野生羊肚菌进行了鉴定,同时分析羊肚菌属真菌的系统发育关系,探讨该技术在羊肚菌属真菌类群划分和类群以下种鉴定中的应用。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

本研究供试菌株包括11个分类单元和2个没有鉴定到种的菌株共82份材料。其中,FJ860052为河南省郑州市南郊十八里河自然发生羊肚菌的孢子分离菌株。根据外观形态特征,该真菌被鉴定为粗柄羊肚菌^[8]。本试验对该菌株的ITS序列进行测定。其余材料的ITS序列均来自GenBank中。

1.2 ITS序列测定

供试菌株菌种活化培养后,取菌丝块接种于土豆液体培养基(土豆250g,葡萄糖10g,蛋白胨5g,水1000ml),25℃静置培养7d。捞取菌丝体,用4层无菌纱布挤干游离水分。取1g左右菌丝体,加液氮充分研磨成粉末,迅速转移至1.5ml离心管中,提取基因组DNA。基因组DNA提取、ITS区域的特异性PCR扩增等操作方法参见文献^[9]。PCR扩增产物直接测序。序列测定由上海生工生物工程有限公司完成。

1.3 系统发育分析

将测定的羊肚菌ITS序列提交到NCBI数据库,获得基因号。搜索NCBI GenBank中羊肚菌属真菌的ITS序列,下载较为完整的序列信息。将82份序列用Clustal X软件进行初步比对,剔除ITS序列前后的18S和28S序列,使序列信息尽可能一致。用

MEGA3.1软件做进化分析,UPGMA(非加权组平均法)聚类分析,对得到的进化树进行自举法分析(Bootstrap analysis)(1000次重复),随机种子(Seed)缺省构建系统发育树^[10-11]。

2 结果与分析

测定菌株的ITS序列提交GenBank,获得基因号FJ860052。将该序列提交NCBI数据库进行BLAST比对分析,结果显示与基因库中15个粗柄羊肚菌ITS序列同源性均在99%以上,表明与形态分类结果一致,试验菌株为粗柄羊肚菌。基于82份ITS序列材料,对羊肚菌属真菌进行进化分析,获得该属真菌的系统发育树(图1)。从图1可以看出,本研究试验菌株FJ860052被聚类在第2类群中。在该类群,16份粗柄羊肚菌材料中的15份在较高的遗传距离上聚在一起。因而,与形态鉴定结果和ITS序列比对分析结果一致,测定菌株为粗柄羊肚菌。

羊肚菌属真菌的ITS系统发育树在大于0.10的遗传距离上被分为2大类群I、II和2小类群III、IV(图1)。类群I中包括全部的高羊肚菌、黑脉羊肚菌、肋脉羊肚菌(*M. costata*)、尖顶羊肚菌、*M. gigas*和1个未鉴定到种的SCO428菌株,另外有4个羊肚菌(*M. esculenta*)散乱地分布在本类群中。高羊肚菌、肋脉羊肚菌、尖顶羊肚菌和黑脉羊肚菌的聚类没有表现出种间特异性,相互穿插聚类在这个大类群之间,它们之间的最远遗传距离为0.02348;*M. gigas*和本群中的其他菌株都相距较远,遗传距离为0.08604,在整体上和羊肚菌属中的其他菌株遗传距离更大。类群I与类群II之间的遗传距离较小(0.10134),与类群III之间的遗传距离稍远(0.11886),与类群IV之间的遗传距离较远(0.71938)。本研究中类群I主要包括黑羊肚菌种类,与Bunyard等^[12]的研究结果“黑脉羊肚菌、尖顶羊肚菌与高羊肚菌可能分别属于同一生物学种的早、中、晚3个发育阶段”基本一致。散乱地分布在类群I中的4个羊肚菌材料(EU600240、EU600241、AJ544202、AJ698475)的ITS碱基数均在650bp左右,而该种其他大部分聚类在类群II的ITS材料的碱基数均在1050bp左右。据报道,羊肚菌不同菌株的ITS序列存在长度差异,但应在1200bp左右^[13-14]。因而,这4个聚类混乱的羊肚菌的ITS序列材料或分类命名可能是不准确的。



图1 羊肚菌属真菌 ITS 序列系统发育分析聚类图

Fig.1 Phylogenetic analysis of *Morchella* spp. based on ITS sequences

本研究中,类群Ⅱ包括全部的小海绵羊肚菌(*M. spongiola*)和粗柄羊肚菌,以及大部分羊肚菌(17个材料中的13个),另外还有1个普通羊肚菌(*M. vulgaris*)、1个小海绵羊肚菌变种和1个未鉴定到种的MA4SSI7菌株。其中小海绵羊肚菌、粗柄羊肚菌和大部分的羊肚菌分别在种间可以清晰地聚为独立的小类群。类群Ⅱ与类群Ⅲ之间的遗传距离较小(0.188 67),与类群Ⅳ之间的遗传距离较大(0.789 19)。本研究将黄羊肚菌(普通羊肚菌)种类,即小羊肚菌、羊肚菌和粗柄羊肚菌等聚类在1个类群,与Kellner等的报道^[15]一致。该研究分析了德国和法国的羊肚菌多样性,指出普通羊肚菌可能是羊肚菌的同物异名。有报道认为,黄羊肚菌类群的一些种类可能是相同的物种,同功酶多态性研究表明,小羊肚菌与美味羊肚菌属于同1个种^[16-17];菌丝融合研究表明,小羊肚菌、羊肚菌和粗柄羊肚菌即使不是同1个种,在遗传上也必定存在密切关系^[18];酶联免疫吸附分析表明,小羊肚菌、羊肚菌和粗柄羊肚菌属于同1个种^[19]。本研究没有涉及到小羊肚菌的ITS序列信息,因而无法对其进行比较分析。但小海绵羊肚菌、粗柄羊肚菌和羊肚菌的ITS遗传相似性分析表明,即使在较低的遗传距离(0.016 25)三者可以聚类为黄羊肚菌类群,但它们仍然是独立的种,相互之间有清晰的遗传差异。该结果与Kellner等的研究一致^[15]。该研究通过ITS/RFLP聚类分析,可以很清晰地把小海绵羊肚菌、粗柄羊肚菌和羊肚菌区分为3个独立的种。

本研究将2个红褐羊肚菌聚类为类群Ⅲ,也是首次将菌柄变红的红褐羊肚菌聚为独立的类群Ⅲ。该类型2份材料,一个来自中东以色列(DQ355921),一个来自南美洲墨西哥(DQ355922),二者只有3个碱基的差异。在进化距离上,它们和其他羊肚菌属材料相差较大,在0.118 6和0.188 7的遗传距离上才能与类群Ⅰ和类群Ⅱ聚在一起。菌柄变红的羊肚菌主要分布于热带和亚热带地区,类似的种还有危地马拉羊肚菌和硬羊肚菌。由于无法找到危地马拉羊肚菌和硬羊肚菌的ITS序列,所以没有研究菌柄变红羊肚菌之间的系统发育关系。

本研究中,半开羊肚菌被聚类在1个遗传距离最远的独立类群Ⅳ,且与黑羊肚菌、黄羊肚菌以及菌柄变红羊肚菌类群之间的遗传距离较远。半开羊肚菌很早就被视为独立的类群^[20-22],形态学、细胞学

等方面的研究也支持半开羊肚菌为1个独立的分类群^[23]。ITS RFLP分析可以很容易将半开羊肚菌与黑羊肚菌和黄羊肚菌区分开来^[24],与本研究ITS序列系统发育分析结果一致。

参考文献:

- [1] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京:科学出版社,1979:238.
- [2] 李华,包海鹰,李玉. 羊肚菌研究进展[J]. 菌物研究,2004,2(4):53-60.
- [3] KIRK P M, CANNON P F, DAVID J C, et al. Ainsworth & bisby's dictionary of the fungi, tenth edition[M]. Europe-UK CABI Publishing,2008:438.
- [4] BUNYARD B A, NICHOLSON M S, ROYSE D J. Phylogeny of the genus *Agaricus* inferred from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA[J]. Fungal Gen Biol,1996,20(4):243-253.
- [5] 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,2004,96:799-811.
- [6] GARDES M, BRUNS T D. ITS primers with enhanced specificity of basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Mol Ecol,1993,2:113-118.
- [7] GRASER Y, FARI M E, VILGALYS R, et al. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region[J]. Med Mycol,1999,37:105-114.
- [8] 何培新,楼海军,申进文. 郑州市粗柄羊肚菌生境调查分析[J]. 河南农业科学,2009(2):95-97.
- [9] 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):44-47.
- [10] HAJIME O, KAZUHO I, TAKASHI G. Eukaryotic nuclear structure explains the evolutionary rate difference of ribosome export factors[J]. Gene,2008,421:7-13.
- [11] WANG L, DU Y, HE Y, et al. Sequence analysis and comparison of rDNA-ITS1 of geographical populations of *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) from China and closely related species[J]. Acta Entomologica Sinica,2007,50:597-603.
- [12] BUNYARD B A, NICHOLSON M S, ROYSE D J. A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene[J]. Mycologia,1994,86(6):762-772.
- [13] BUSCOT F, WIPF D, DI B, et al. DNA polymorphism in morel PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR[J]. Mycol Res,1996,100(1):63-71.
- [14] WIPF D, MUNCH J C, 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]. Appl Environ Microbiol,1996,62(9):3541-3543.

- [15] KELLNER H, RENKER C, BUSCOT F. Species diversity within *Morchella esculenta* group (Ascomycota; Morchellaceae) in Germany and France [J]. *Organisms Diversity Evol*, 2005, 5: 101-107.
- [16] GESSNER R V, ROMANO M A, SCHULTZ R W. Allelic variation and segregation in *Morchella deliciosa* and *M. esculenta* [J]. *Mycologia*, 1987, 79: 683-687.
- [17] YOON C, GESSNER R V, ROMANO M A. Population genetics and systematics of the *Morchella esculenta* complex [J]. *Mycologia*, 1990, 82: 227-235.
- [18] VOLK T J, LEONARD T J. Experimental studies on the morel I. Heterokaryon formation between monoascosporous strains of *Morchella* [J]. *Mycologia*, 1989, 81: 523-531.
- [19] JUNG S W, GESSNER R V, KUEDELL K C, et al. Systematics of *Morchella esculenta* complex using enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Mycologia*, 1993, 85: 677-684.
- [20] GROVES J W, HOARE S C. The Helvellaceae of the Ottawa district [J]. *Can Field Nat*, 1953, 67(3): 95-102.
- [21] RIFAI M A. The Australasian Pezizales in the herbarium of the royal botanic gardens, Kew [M]. Amsterdam: Noord-Hollandische, 1968: 1-295.
- [22] NANCY S W, DAN E G. A field guide to southern mushrooms [M]. Ann Arbor: The University of Michigan Press, 1985: 1-280.
- [23] GUZMAN G, TAPIA F. The known morels in Mexico, a description of a new blushing species, *Morchella rufobrunnea*, and new data on *M. guatemalensis* [J]. *Mycologia*, 1998, 90: 705-714.
- [24] SINGH S K, TIWARI M, KAMAL S, et al. Morel phylogeny and diagnostics based on restriction fragment length polymorphism analysis of ITS region of 5.8S ribosomal RNA gene [J]. *J Plant Biotech Biotechnol*, 2005, 14(2): 179-183.