

采自甘南州的21株野生羊肚菌的分子学鉴定

杨琴¹, 王三喜², 王海峰², 冶晓燕³

(1. 甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘南藏族自治州农业科学研究所, 甘肃 甘南 747000; 3. 西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 甘南藏族自治州境内高寒阴湿温差大, 土壤肥力高, 适宜羊肚菌生长。经对采自甘南藏族自治州的野生羊肚菌进行组织分离, 获得21份菌丝培养物, 并对其采用ITS、*efl-α*、*rpb1*以及*rpb2*片段联合矩阵序列分析鉴定。结果表明, 21个供试菌株均属黑色羊肚菌支系, 其中19株为三地羊肚菌(*Morchella eohespera*), 2株为羊肚菌属Mel-13, 且这2种羊肚菌目前已实现人工栽培。

关键词: 甘南藏族自治州; 羊肚菌; 分子鉴定; 序列联合分析

中图分类号: S646.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2021)05-0050-04

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2021.05.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2021.05.012)

Molecular Identification of 21 Strains of Wild *Morchella* spp. from Gannan Tibetan Autonomous Prefecture

YANG Qin¹, WANG Sanxi², WANG Haifeng², YE Xiaoyan³

(1. Institute of Vegetable, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Agricultural Science Research Institute of Gannan Tibetan Autonomous Prefecture, Gannan Gansu 747000, China; 3. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: Gannan Tibetan Autonomous Prefecture has high cold damp, large temperature difference between day and night, and fertile soil, which is very suitable for the growth of *Morchella* spp. 21 mycelium cultures were obtained by tissue isolation from wild *Morchella* collected from Gannan Tibetan Autonomous Prefecture in this study, and were identified by ITS, *efl-α*, *rpb1* and *rpb2* joint matrix sequence analysis. The results showed that all the 21 strains were Elata Clade, 19 of which were *Morchella eohespera*, and 2 strains were *Morchella* spp. Mel-13. Moreover, these two kinds of *Morchella* have been cultivated artificially.

Key words: Gannan Tibetan Autonomous Prefecture; *Morchella* spp.; Molecular identification; Sequence joint analysis

羊肚菌(*Morchella* spp.)隶属于囊菌亚门(Ascomycota)盘菌纲(Pezizomycetes)盘菌目(Pezizales)羊肚菌科(Morchellaceae), 是一类世界公认的珍稀食药同源真菌, 也是目前国际上最重要的贸易真菌之一^[1], 其子实体、菌丝、液体培养物中含有多糖、酶、脂肪酸、氨基酸、维生素、抗生素、甾醇等多种有效成分, 在抗菌、抗肿瘤、抗氧化、保

肾护肝、提高免疫力等方面均有显著作用^[2], 独含的脯氨酸类似物具特殊香味, 已被广泛应用于调味品以及食品添加剂领域^[3]。

羊肚菌是一类喜凉的大型真菌, 主要分布在北温带和寒温带地区, 目前已知的羊肚菌分为3大类群: 黄色羊肚菌支系(Esculenta Clade)、黑色羊肚菌支系(Elata Clade)以及变红羊肚菌支系(Rufobrunnea Clade)^[4], 共

收稿日期: 2021-04-15

基金项目: 甘肃省现代农业科技支撑体系区域创新中心重点项目(2019GAAS52)。

作者简介: 杨琴(1983—), 女, 甘肃兰州人, 助理研究员, 硕士, 主要从事食用菌资源与利用研究。Email: gsyangqin06@163.com。

有 61 种, 中国就分布着其中的 30 种^[5]。甘南藏族自治州地处青藏高原东北边缘地区, 境内海拔 1 173 ~ 4 920 m, 年平均气温 1 ~ 13 °C, 高寒阴湿温差大, 土壤为黑土类, 肥力高、土质疏松, 得天独厚的环境极利于羊肚菌生长^[6]。随着现代分子生物学的发展, 利用特异性基因片段进行物种鉴定已是当下生物学研究中常用的手段之一, 目前大多数研究利用 ITS 片段就能对试验对象做出鉴定, 但有研究显示, 利用 ITS 序列仅能识别出约羊肚菌属 76% 的系统发育学物种, 而利用 ITS+*efl-α*+*rpb1*+*rpb2* 多基因联合分析, 则能鉴定出该属内的所有物种^[7]。我们对从甘南藏族自治州获得的野生羊肚菌菌丝培养物采用 ITS、*efl-α*、*rpb1* 以及 *rpb2* 片段联合矩阵序列分析进行分子鉴定与系统发育学分析, 旨在准确鉴定甘南州野生羊肚菌资源类型, 为当地羊肚菌资源的科学利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 2019—2020 年, 在羊肚菌子实体发生季对甘南藏族自治州夏河县、卓尼县、迭部县的野生羊肚菌进行了采集, 通过组织分离共得到 21 份可产生菌核的菌丝培养物, 编号为 GN-M1、GN-M2、GN-M3、GN-M4、GN-M5、GN-M6、GN-M7、GN-M8、GN-M9、GN-M10、GN-M11、GN-M12、GN-M13、GN-M14、GN-M15、GN-M16、GN-M17、GN-M18、GN-M19、GN-M20、GN-M21。

1.1.2 药品和试剂 PDA 合成培养基、HP Fungal DNA Kit D3195-01 试剂盒、琼脂糖、TAE 等, 均由北京奥科鼎盛生物公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 采用柱式 HP Fungal DNA Kit D3195-01 试剂盒提取供试菌株菌丝总 DNA。

1.2.2 DNA 扩增 本试验需要 4 对扩增引物^[8], 具体序列详见表 1。扩增反应体系:

采用 25 μL 体系, 正反引物各 1 μL, 2 × Taq Mix 酶 12.5 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 补充至 25 μL; 扩增反应过程: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 10 s, 复性 15 s (ITS 50 °C、*efl-α* 58 °C、*rpb1* 55 °C、*rpb2* 54 °C), 72 °C 延伸 20 s, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 8 min, 4 °C 保存。

表 1 扩增位点、引物名称及引物序列

位点	引物	序列
ITS	ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGT AACAAGG-3'
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3'
<i>rpb1</i>	<i>rpb1</i> -F	5'-AACCGGTATATCACC TYGGTAT-3'
	<i>rpb1</i> -R	5'-GCCTCRAATTCGTTG ACRACGT-3'
<i>rpb2</i>	<i>rpb2</i> -F	5'-TAGGTAGGTCCCAAG AACACC-3'
	<i>rpb2</i> -R	5'-GATACCATGGCGAAC ATTCTG-3'
<i>efl-α</i>	<i>efl-α</i> -F	5'-ACTCCTAAGTACTAT GTCACCGTCATT-3'
	<i>efl-α</i> -R	5'-TGGAGAGGAAGACC GAGAGGCTT-3'

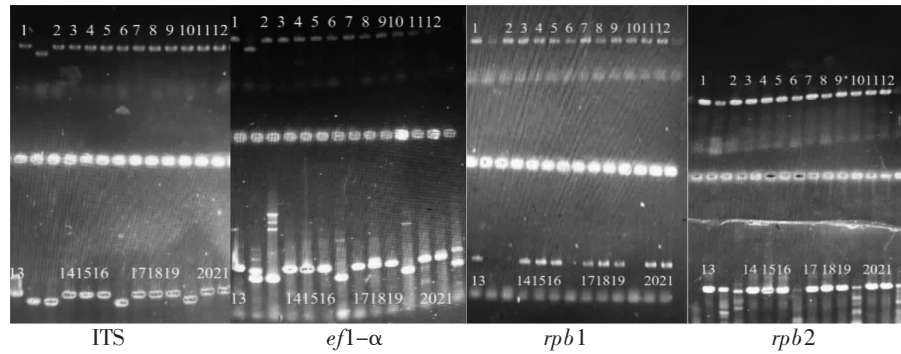
1.2.3 扩增产物的检测与测序 将 1.2.2 中引物 ITS、*efl-α*、*rpb1*、*rpb2* 的扩增产物采用 1% 的琼脂糖电泳 (100 mL 1 × TAE+1g 琼脂糖) 进行检测, 检测完好后送至北京奥科鼎盛生物公司测序。

1.2.4 测序结果对比及系统发育学分析 测序得到的序列在 NCBI 中进行 BLAST, 下载同源性大于 99% 的序列进行系统发育学分析; 分别构建 ITS、*efl-α*、*rpb1*、*rpb2* 矩阵, 在 BioEdit 中进行调整, 最后整合成联合矩阵, 采用 MEGA 7.0 软件 Neighbor-joining 聚类分析方法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 供试菌株的 DNA 扩增分析

供试菌株的 4 个特异性片段经 PCR 扩增后对其产物进行琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示。21 株供试菌株的 4 个特异性



序号 1 至 21 分别代表菌株 GN-M1 至 GN-M21, 未编号的电泳条带为杂菌。

图 1 ITS、*ef1-α*、*rpb1*、*rpb2* 片段扩增结果

片段扩增很好, 电泳条带清晰单一。

2.2 供试菌株的系统发育分析

对测序筛选同源性较高的序列进行 ITS、*ef1-α*、*rpb1*、*rpb2* 序列联合矩阵分析和系统发育树构建, 结果见图 2。由图 2 可知, 供试菌株分属于 2 个类群, 其中菌株 GN-M1 ~ GN-M18、GN-M21 共 19 株, 与 *Morchella eohespera*(三地羊肚菌)亲缘关系近; GN-M19 和 GN-M20 与 *Morchella sp. Mel-13* 亲缘关系近。支持率均为 99%。

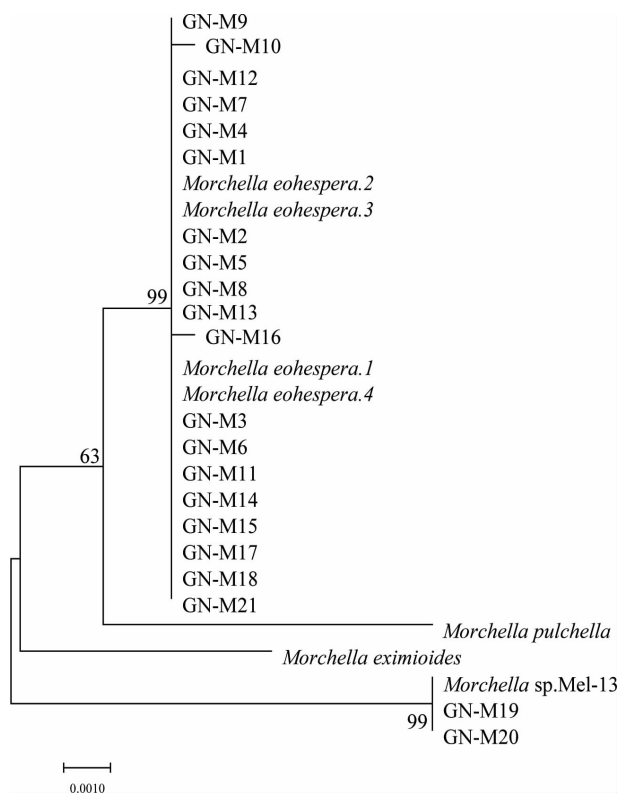


图 2 基于 ITS、*ef1-α*、*rpb1*、*rpb2* 序列联合矩阵的羊肚菌系统发育树

3 结论与讨论

采用 ITS、*ef1-α*、*rpb1*、*rpb2* 序列联合矩阵分析对分离得到的可产核的野生羊肚菌菌丝进行了鉴定, 确定供试菌株均属于黑色羊肚菌支系, 其中 GN-M1、GN-M2、GN-M3、GN-M4、GN-M5、GN-M6、GN-M7、GN-M8、GN-M9、GN-M10、GN-M11、GN-M12、GN-M13、GN-M14、GN-M15、GN-M16、GN-M17、GN-M18、GN-M21 为三地羊肚菌(*Morchella eohespera*); GN-M19、GN-M20 为羊肚菌属(*Mel-13*), 这 2 个种目前已实现人工栽培^[9], 为开发甘肃省高寒冷凉区本土化羊肚菌品种提供了可能。

此次羊肚菌资源调查所得物种仅有 2 个, 可能是由采集时间和地点过于集中所致。后续研究应该按不同时段, 并且分散调查地点采集标本, 更全面的获得甘南藏族自治州的野生羊肚菌标本, 以便更准确地分析该物种在甘南州的分布, 为进一步开发利用当地野生菌资源提供依据。

参考文献:

[1] VOITK, ANDRUS, MICHAEL W. BEUG, et al. Two new species of true morels from Newfoundland and Labrador: cosmopolitan *Morchella eohespera* and parochial *M. laurentiana*[J]. Mycologia, 2016, 108(1): 31-37.

[2] 尚千涵, 杨婷, 高其媛, 等. 羊肚菌属物种分类、系统进化和药用价值研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(7): 2154-2162.

[3] 袁明生, 孙佩琼. 四川蕈菌[M]. 成都: 四川

潜叶蝇幼虫在二月兰的田间空间分布型及其抽样技术

李平¹, 戴伟²

(1. 武威市农业技术推广中心, 甘肃 武威 733000; 2. 武威恒丰源农业科技有限公司, 甘肃 武威 733000)

摘要: 采用空间分布型检验、聚集强度指标检验和线形回归方法研究了潜叶蝇幼虫在二月兰的田间分布型及其抽样技术。结果表明: 潜叶蝇幼虫在二月兰的田间分布呈聚集分布, 聚集程度受环境影响较大, 幼虫的理论抽样模型 $n=3.841 6/D^2(1.541 2/\bar{x}+0.030 6)$ 。

关键词: 潜叶蝇; 二月兰; 空间分布型; 理论抽样模型

中图分类号: S436.8; S681.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2021)05-0053-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2021.05.013

二月兰 (*Orychophragmus violaceus*) 别名诸葛菜, 属十字花科诸葛菜属越年生矮生草本植物, 其适生性、抗逆性、耐寒性、繁殖力强, 对土壤条件要求不高, 是北方地区重要的绿肥资源植物^[1], 也是人们常见的野生蔬菜。广泛生长在平原、山地、路旁、地边、林缘、宅旁、林下、滩湖边等处, 具有食、饲、药、观赏、调节生境、培肥地力等多种开发利用价值。据测定, 每 100 g 鲜品中含胡萝卜素 3.32 g、维生素 B₂ 0.16 mg、维生素 C 59 mg 以及人体所需的多种矿物

质。其种子含油量超过 50%, 属良好的油料植物之一, 提取油中亚油酸含量较高, 具有降低人体内血液胆固醇和甘油三酯的功能。用作食用, 不仅清新爽口, 并能阻止血栓形成、治疗心血管疾病等作用; 用作饲料, 能提高母畜泌乳能力、仔畜体重、家禽产蛋率和免疫力的功能; 用作景观绿化, 可以点缀美化环境; 实行农田套种, 能起到地表覆盖、调节生境, 为天敌提供适宜的栖息场所和提高土壤有机质、培肥地力的作用^[1]。二月兰是甘肃河西灌区间作或套种的常见绿肥

收稿日期: 2021-02-03

作者简介: 李平(1983—), 男, 陕西西安人, 农艺师, 硕士, 主要从事植物保护方面的研究和推广工作。Email: 274620558@qq.com。

科学技术出版社, 1995.

- [4] RICHARD, FRANCK, JEAN-MICHEL BEL-LANGER, et al. True morels (*Morchella*, *Pezizales*) of Europe and North America: Evolutionary relationships inferred from multilocus data and a unified taxonomy[J]. *Mycologia*, 2014, 107(2): 359-382.
- [5] 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.
- [6] 王海峰, 王三喜, 杨琴. 甘南藏族自治州野生羊肚菌生长环境调查[J]. *农业技术与装备*, 2021(1): 37-38.

- [7] DU XIHUI, ZHAO QI, YANG ZHULIANG, 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.
- [8] 赵建俊, 吉建成, 于国民, 等. 采自山东的几株野生羊肚菌鉴定[J]. *中国食用菌*, 2020, 39(12): 28-32.
- [9] 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.

(本文责编: 陈珩)