

研究报告

一株祁连野生羊肚菌多基因联合分子鉴定及其生物地理分析

孟清^{1,2}, 马婷¹, 谢占玲^{*1,2}, 徐鸿雁³, 杨家宝^{1,2}

1 青海大学生态环境工程学院, 青海 西宁 810016

2 青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室, 青海 西宁 810016

3 青海省农林科学院, 青海 西宁 810016

孟清, 马婷, 谢占玲, 徐鸿雁, 杨家宝. 一株祁连野生羊肚菌多基因联合分子鉴定及其生物地理分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 127-139.

MENG Qing, MA Ting, XIE Zhanling, XU Hongyan, YANG Jiabao. Taxonomic identification and biogeographic analysis of a wild strain of *Morchella* in Qilian based on multiple genes[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 127-139.

摘要: 【背景】青海野生羊肚菌野生资源丰富, 但物种识别度低, 相关研究滞后。【目的】鉴定识别采集自青海祁连的野生羊肚菌并分析其生物地理。【方法】利用形态学、多基因谱系一致性系统发育学物种识别法与多基因分子系统学相结合的方法, 鉴定野生羊肚菌并分析该物种分化和重建祖先区域。【结果】野生羊肚菌菌株 MQL-1 子实体菌盖呈黄褐色, 圆顶, 菌柄呈白色、中空, 形似羊肚菌, 孢子大小为 $(21.17\pm 4.33)\ \mu\text{m}\times(14.26\pm 3.25)\ \mu\text{m}$, 菌丝直径 $(13.95\pm 3.19)\ \mu\text{m}$ 。系统发育分析结果表明分离到的菌株 MQL-1 与羊肚菌属中的黄色羊肚菌类群的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列相似性高达 99%, 多基因谱系一致性系统发育学物种识别法将 MQL-1 识别为粗柄羊肚菌(*Morchella crassipes*)。分化时间估算和祖先重建结果表明青海祁连粗柄羊肚菌 MQL-1 与云南 *M. crassipes* M10 的分化时间 12.75 Mya (百万年前), 其重建的最可能的祖先区域为印度(52.49%)。【结论】本研究得到了一株青海祁连地区粗柄羊肚菌菌株并确定了其正确的科学命名, 丰富了青海省羊肚菌资源信息数据库, 为后续的工作奠定了基础, 也为真菌研究提供新思路。

关键词: 羊肚菌; 形态类型; 多基因谱系一致性系统发育学物种识别法; 多基因分子系统学; 分化时间; 祖先区域重建

资助项目: 2021 年第一批中央林业草原生态保护恢复资金(2021-87); 青海省科技成果转化专项(2024-0204-SFC-0013)

This work was supported by the Funding from the First Round of Central Forestry Grassland Ecological Protection and Restoration Funds will be Available in 2021 (2021-87) and the Special Project for the Transformation of Scientific and Technological Achievements of Qinghai Province (2024-0204-SFC-0013).

*Corresponding author. E-mail: xiezhanling2012@126.com

Received: 2023-07-06; Accepted: 2023-08-24; Published online: 2023-10-11

Taxonomic identification and biogeographic analysis of a wild strain of *Morchella* in Qilian based on multiple genes

MENG Qing^{1,2}, MA Ting¹, XIE Zhanling^{*1,2}, XU Hongyan³, YANG Jiabao^{1,2}

1 College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

2 Qinghai Provincial Key Laboratory Breeding Base for Innovation and Utilization of Plateau Crop Germplasm, Xining 810016, Qinghai, China

3 Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: [Background] Qinghai harbors rich wild *Morchella* resources, whereas studies remain to be carried out for the species identification and characterization. [Objective] To identify a wild *Morchella* strain collected from Qilian, Qinghai and analyze its biogeography. [Methods] The morphological characteristics were combined with genealogical concordance phylogenetic species recognition and the phylogenetic analyses to identify the *Morchella* strain. Furthermore, species divergence time was analyzed and the geographic ancestral region was rebuilt. [Results] The strain MQL-1 presented a yellow-brown domed cap and a white hollow stalk, with a spore size of $(21.17 \pm 4.33) \mu\text{m} \times (14.26 \pm 3.25) \mu\text{m}$ and a hyphal diameter of $(13.95 \pm 3.19) \mu\text{m}$. Strain MQL-1 had 99% ITS sequence identity with *Esculenta* clade of the genus *Morchella*, and the genealogical concordance phylogenetic species recognition identified MQL-1 as *Morchella crassipes*. The estimated divergence time and reconstructed geographic ancestral region indicated that *M. crassipes* MQL-1 diverged from *M. crassipes* M10 at approximately 12.75 Mya (million years ago), and its most likely reconstructed geographic ancestral region was India (52.49%). [Conclusion] We isolated and identified a wild *Morchella* strain in Qinghai. This study enriched the information database of *Morchella* resources in Qinghai, laid a foundation for the follow-up work, and provided new ideas for fungal research.

Keywords: *Morchella*; morphotype; genealogical concordance phylogenetic species recognition (GCPSR); phylogenetic analysis based on multiple genes; divergence time; ancestral region reconstruction

羊肚菌属 (*Morchella* Dill. ex Pers.: Fr.) (Persoon C.H. 1794)^[1], 隶属于真菌界(Eumycetes), 子囊菌亚门 (*Ascomycotina*), 羊肚菌科 (*Morchellaceae*), 其菌盖表面有羊肚状的凹坑及不规则棱纹, 故名羊肚菌, 是一类稀有的具有极高药用和食用价值的大型真菌^[2]。近年来的一些分子研究证实, 羊肚菌是一个物种丰富的属, 通过分子系统发育学推断羊肚菌有 80 多个种级谱系, 其中有 58 个是已解决并无争议的系统发育学物种名, 其主要分布在北半球温带

地区^[3-4]。羊肚菌属单个物种在北半球表现出高度的大陆特有性和地方性, 在不止一个大陆上记录了大约 20 个物种^[5]。中国是羊肚菌物种多样化的主要中心之一, 最新多基因谱系一致性系统发育学物种识别(genealogical concordance phylogenetic species recognition, GCPSR)数据显示, 中国报道有 37 个不同的系统发育学物种, 其中包括 16 个黑色支系系统发育种和至少 21 个黄色支系系统发育种^[6-7]。然而, 由于目前关于羊肚菌的文献比较混乱, 羊肚菌物种多样性有

待进一步调查研究。

羊肚菌肉质脆嫩、味道鲜美和营养成分丰富全面,导致市场的需求量与日俱增,但可利用的野生羊肚菌资源较少,因此,准确鉴定有效的野生羊肚菌资源是实现羊肚菌人工栽培的关键因素之一,也是实现对野生羊肚菌资源有效保护利用的前提^[2,8]。青海气候冷凉,昼夜温差大的气候优势孕育了丰富的羊肚菌资源。然而,受到近期气候变化和人类活动影响,羊肚菌属物种栖息地严重片段化和破碎化,使这种珍稀资源面临逐年减少,有关分类研究却一直比较滞后。野生羊肚菌出菇期短,分布数量有限,青海境内仅分布有粗柄羊肚菌(*M. crassipes*)、三地羊肚菌(*M. eohespera*)和庭院羊肚菌(*M. hortensis*)^[9]。然而,此前青海野生羊肚菌资源调查研究仅停留在形态学水平,未见有深入的分子系统学研究。摸清野生羊肚菌资源的生态习性、给予准确的物种鉴别,是把握有限资源并充分发挥其作用和价值的关键一步。

前期的研究指出羊肚菌科(*Morchellaceae*)在三叠纪中期形成,羊肚菌属(*Morchella*)、钟菌属(*Verpa*)和皱盘菌属(*Disciofis*)在白垩纪早期分化形成^[10]。伴随着地质活动在整个演化过程中,古老的羊肚菌物种通过北大西洋陆桥迁移到欧洲,而大部分的羊肚菌物种则通过白令大陆桥迁移传播至亚洲地区,繁衍生息^[11-13]。另外,地中海地区集中了古老的遗迹(古地方性)物种和最近迅速分化的(新地方性)羊肚菌品系,被推定为羊肚菌最有可能的祖先区域,该起源于地中海的假设比起源于北美或亚洲的假设更为简约可靠^[4]。第四纪冰期由于气候急剧变冷,在处于冰期与间冰期循环改变的气候中,生物多样性与地理分布区受到较大的变化,西海岸和东海岸为北美羊肚菌避难所,地中海沿岸为欧洲羊肚菌避难所;地理隔离、海侵、山脉抬升、

气候变冷和青藏高原隆起引起东亚气候变化及环境异质化等因素导致羊肚菌属物种分化^[8,11,13]。羊肚菌属的演化历史和生物地理学等方面的研究取得了许多有重要意义的结果^[1,3-4,8,10-13],而特定区域单一物种的生物地理学研究较少。本研究采集了青海祁连地区的野生羊肚菌,探究该地适宜野生羊肚菌发生的条件,利用形态学分类方法进行初步鉴定,并通过组织分离法收获纯菌丝体,提取DNA进行PCR扩增后在内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列分析物种多样性的基础上,进一步采用基于ITS+核糖体28S大亚基(ribosomal large subunit, LSU)+翻译延长因子1 α (translation elongation factor 1- α , *TEF1*)+RNA聚合酶II大亚基(RNA polymerase II, *RPB1*)+RNA聚合酶II小亚基(RNA polymerase II, *RPB2*)这5个基因片段的多基因联合分析方法对采集分离的野生羊肚菌进行系统发育分析,确定种属关系,旨在为后续青海地区野生羊肚菌资源的培育驯化及有效保护利用提供可靠依据。另外,在得到确切物种类型的基础上,基于单基因和多基因联合的分子系统学分析物种分化时间,并重建单一物种的祖先分布区域,补充单一羊肚菌物种生物地理学的信息。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株

2022年5月20日在青海省祁连县扎麻什乡采集到一株野生羊肚菌,采集好的样品用软纸包好放至样品袋中,保持样品完整,带回实验室分析。纪录野生羊肚菌子实体生长区域内的植物组成,以及地貌类型、坡向、坡度和郁闭度等生境因子,填写调查表。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar,

PDA)培养基(g/L): 去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 18.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

2×Taq PCR MasterMix、4S Gelred 核酸染料与 DL2000 DNA Marker 以及引物合成均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。紫外可见分光光度计, 上海美析仪器有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; PCR 仪, 艾本德股份公司; 显微镜, 尼康精机(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 野生羊肚菌鉴定

形态学鉴定: 测量菌盖和菌柄大小, 并描述颜色、形状和菌盖边缘是否向外延伸, 记录横、纵棱纹数量等。切取新鲜菌盖菌褶制作临时装片, 在显微镜下对子囊及子囊孢子进行观察及拍照, 并测量其大小。

菌株分离与显微观察: 将野外采集的待定种子实体, 采用组织分离法获得纯菌种。通过组织分离法获得试管斜面培养基中的纯羊肚菌菌丝体后, 将其接种至 PDA 平板培养基上, 用消毒过的镊子将灭菌处理的盖玻片以 45° 插入 PDA 培养基中, 插片位置距中心 1.0–1.5 cm 为宜, 令菌丝体爬片生长。观察菌丝体生长情况, 待菌丝体长满盖玻片, 将其轻轻拔出, 于显微镜下观察菌丝体形态^[2]。

1.2.2 多基因谱系一致性系统发育物种识别

采用改良版 CTAB 法提取菌株 DNA。提取的 DNA 通过 1% 琼脂糖、1×Tris 乙酸盐 EDTA 缓冲液电泳(电压 120–180 V)检测, 若有明显的条带说明其浓度满足 PCR 要求, 后置于 -20 °C 冰箱中保存。PCR 反应体系、反应条件及多基因引物参照武冬梅等^[7], PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。

系统发育树构建: 使用 Mafft v7.222 软件

对各基因数据集进行多序列比对, 比对后的序列用 Gblock 0.91b 软件删除比对模糊的区域或空位, 选择保守区域。利用 Sequence-Mix v1.7.8 软件将各个单基因数据集串联整合成一个多基因数据集。使用 PhyloSuite v1.2.2 对数据集进行贝叶斯推断法(Bayesian inference, BI)建树分析。用 Figtree v1.4.2 软件和 iTOL (<https://itol.embl.de/tree>)打开文件并分析相应结果。

1.2.3 单一物种分化时间估算

依据羊肚菌属已知的 39 个系统发育种的 4 个基因(ITS+TEF1-RPB1-RPB2)联合矩阵, 使用 BEAST 软件包推断羊肚菌属菌株 MQL-1 的分化时间。化石校准点 1 为变红羊肚菌类群(*Rufobrunnea* clades)分歧时间在侏罗纪晚期为 154.15 Mya, 设置平均值和标准偏差分别为 154.15 和 50.15; 化石校准点 2: 黄色类群(*Esculenta* clades)和黑色类群(*Elata* clades)的分化时间在为 123.46 Mya, 设置平均值和标准偏差分别为 123.46 和 20.46^[11–13]。分子钟模型分别设置为松散分子钟(relaxed clock log normal)。Tree priors 设置为 yule speciation process 作为化石锚定点。隐马尔可夫链(Markov chain monte carlo, MCMC)迭代运算 100 000 000 代, 1 000 代取样一次。设置完成后, 使用 BEAST v1.8.0 独立运行.xml 文件 2 次, 避免随机启动造成的误差并保证足够多的有效取样大小(effective sampling size, ESS), 即 ESS>200。运行结束后, 用 Log Combiner 合并两次运算的结果文件(.log 和 .tree)。用 Tracer 打开合并后的.log 文件, 确保有效取样 ESS 值大于 200。最后用 Tree Annotator 打开.tree 文件, 将后验概率限度设定为 0.5, 从而生成最后所需的标注了最大可信度节点的树(maximum clade credibility tree, MCC tree), 保存为.tree 文件。最后用 iTOL (<https://itol.embl.de/tree>)网站打开文件并分析相应结果^[14–16]。

1.2.4 单一物种祖先区域重建

依据 BEAST v1.8.0 软件包中界定的羊肚菌物种 ITS 序列分析所得到的系统发育树结构^[15,17]。化石校准点 1 为子囊菌群和担子菌群之间的分化时间 582 百万年前(million years ago, Mya), 设置平均值和标准偏差分别为 582.5 和 50.15; 化石校准点 2 为变红羊肚菌类群(*Rufobrunnea* clades)分歧时间在 154.15 Mya, 设置平均值和标准偏差分别为 154.15 和 50.15; 化石校准点 3: 黄色类群(*Esculenta* clades)和黑色类群(*Elata* clades)的分化时间在 123.46 Mya, 设置平均值和标准偏差分别为 123.46 和 20.46。分子钟模型分别设置为 relaxed clock log normal。Tree priors 设置为 yule speciation process 作为化石锚定点。MCMC 迭代运算 100 000 000 代, 1 000 代取样 1 次。采用 RASP v1.1 软件中的扩散-灭绝分支进化模型(dispersal-extinction-cladogenesis, DEG)模型进行基于贝叶斯方法的 Bayesian Binary MCMC (BBM)方法分析, 推测青海祁连羊肚菌 MQL-1 最可能的祖先起源地区。

2 结果与分析

2.1 野生羊肚菌 MQL-1 形态特征

菌株 MQL-1 采自于青海省祁连县扎麻什乡(100°1'6.95"E, 38°11'54.96"N), 海拔约 3 169 m, 属于高原大陆性气候, 温带大陆性季风气候。采集地为阔叶林, 丘陵地貌, 坡向南东, 坡度 2°–10°, 郁闭度 0.4–0.5。菌株 MQL-1 周围有黑麦草、青藏苔草、鹅绒委陵菜、蒲公英等植被伴生, 采集当时温度 21 °C, 东北风 2 级。

经传统形态学鉴定, 野生羊肚菌子实体形态特征如图 1B、1C 所示, 羊肚菌子实体菌盖呈黄棕色, 子实体高(6.45±1.30) cm; 菌盖稍向外延伸, 纵棱纹 8 条, 凹坑不规则, 菌盖长(3.01±0.96) cm, 菌盖最宽处(2.93±0.77) cm。菌

柄米白色, 光滑, 在菌盖菌柄交界处有较明显的纵向皱褶, 菌柄长(2.51±1.11) cm, 最宽处(1.35±0.34) cm。菌株 MQL-1 的子囊并列生长在子实体菌褶表面, 呈指状, 内含 8 个子囊孢子; 子囊孢子椭圆形, 表面光滑, 无色透明, 大小为(21.17±4.33) μm×(14.26±3.25) μm (图 1D)。分离获得的 MQL-1 菌种菌丝颜色初期白色, 菌丝呈辐射状生长(图 1E), 生长 10 d 后呈现深棕色并伴有少量白色菌核(图 1F), 气生菌丝竹节状, 末端较钝(图 1H), 菌丝有隔膜, 直径为(13.95±3.19) μm, 生长 30 d 后菌丝及菌核呈现黄褐色(图 1G)。初步将该菌株鉴定为黄色羊肚菌支系。

2.2 多基因联合矩阵系统发育分析

羊肚菌菌株 MQL-1 基因组 DNA 经 PCR 扩增后分别得到各片段与预期大小一致的特异性条带, 其中 ITS、LSU 和 *TEF1* 序列条带大小约 1 000 bp, *RPB1* 和 *RPB2* 序列条带大小约 750 bp。羊肚菌菌株 MQL-1 的 5 个基因(ITS-LSU-*TEF1*-*RPB1*-*RPB2*)序列已经全部提交至 GenBank 数据库, 登录号分别是 MZ754070、OL423318、OQ944470、OQ944471 和 OQ944472。将 MQL-1 的 ITS 序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 其与粗柄羊肚菌(*Morchella crassipes*, EF081001.1)相似性达 99%, 表明可能为粗柄羊肚菌。选取变红羊肚菌类群物种 *M. rufobrunnea* 和 *M. anatolica* 作为外类群, 羊肚菌属 52 个已知系统发育学物种的 158 条内源转录间隔区 ITS 序列(1 837 bp)作为参比序列, 采用贝叶斯推断法(Bayesian inference, BI)分析系统发育树, 菌株 MQL-1 与粗柄羊肚菌(*Morchella crassipes*) EF081003.1、EF081001.1、OL654279.1、GQ228465.1、MK890799.1、MK439499.1、MZ172458.1、MZ172459.1 和 MA172423.1 聚为一支, BI 树自举支持率为 0.79(>0.6), 支长差异小, 与 BLAST 比对结果一致(图 2)。

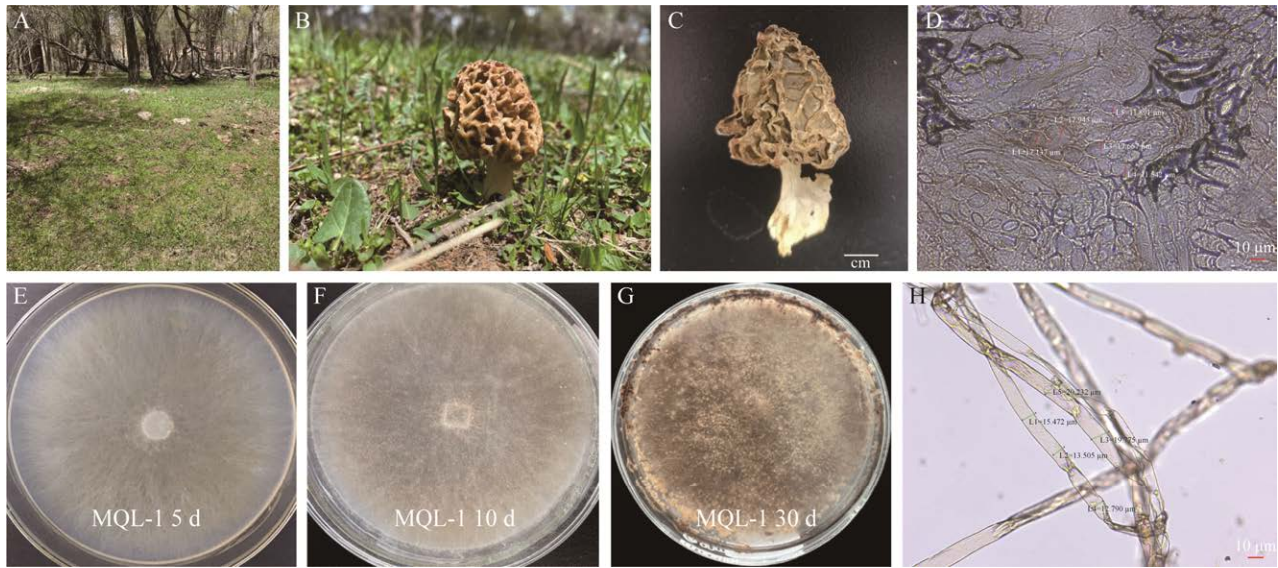


图 1 青海祁连野生羊肚菌形态学特征 A: 青海省祁连县羊肚菌生境. B: 青海省祁连县羊肚菌子实体(新鲜). C: 青海省祁连县羊肚菌子实体(自然晾干). D: 子囊孢子形态. E-G: 菌株 MQL-1 在 PDA 培养基中培养 5、10 和 30 d 的菌落特征. H: 可培养菌丝形态

Figure 1 Morphological characteristics of wild *Morchella* in Qilian, Qinghai. A: Habitat. B: The fruiting body in Qilian, Qinghai (fresh). C: Mycospore (natural drying). D: Morphology of ascospore. E-G: Colony characteristics of strain MQL-1 cultured in PDA medium for 5, 10, and 30 days. H: Mycelial morphology of culturable mycelium.

以变红羊肚菌类群物种 *M. anatolica* 作为外源菌, 联合 ITS+TEF1+RPB1+RPB2 (5 576 bp) 这 4 个基因构建了羊肚菌属 39 个已知系统发育物种的系统发育树, 菌株 MQL-1 与粗柄羊肚菌 (*Morchella crassipes*) M10 聚类在一个分支, BI 树自举支持率为 1 (>0.6), 支长差异极小, 与 ITS 序列建树结果一致(图 3)。

2.3 粗柄羊肚菌 MQL-1 分化时间估算

羊肚菌属祖先分化时间推断基于多片段进行, 结果如图 4 所示, ITS+TEF1+RPB1+RPB2 串联矩阵包含 3 个分类群, 序列拼接后的长度为 11 500 bp, 包含羊肚菌属 39 个物种。粗柄羊肚菌 MQL-1 与 M10 的分化时间约为 12.75 Mya (HPD 95% 1.71-24.79)。

2.4 粗柄羊肚菌 MQL-1 祖先区域重建

在 NCBI 中共计检索并下载 68 条粗柄羊肚菌 (*M. crassipes*) 的 ITS 序列, 包括有中国 20 个

(青海 1 条序列分属 A, 陕西 3 条序列分属 B, 北京 2 条序列分属 C, 云南 5 条序列分属 D, 四川 3 条序列分属 E, 河北 1 条序列分属 F, 湖南 2 条序列分属 G, 贵州 3 条序列分属 H), 印度 11 条序列(分属 I), 韩国 2 条序列(分属 J), 巴基斯坦 5 条序列(分属 K), 以色列 2 条序列(分属 L), 印度尼西亚 1 条序列(分属 M), 德国 6 条序列(分属 N), 法国 9 条序列(分属 O), 塞尔维亚 1 条序列(分属 P), 乌克兰 2 条序列(分属 Q), 加拿大 1 条序列(分属 R), 美国 1 条序列(分属 S), 埃及 7 条序列(分属 T)。对世界范围内粗柄羊肚菌进行了祖先地理范围的重建, 结果如图 5 所示, 印度(I)是粗柄羊肚菌起源中心的概率为 27.99%, 粗柄羊肚菌可以分为 4 个 Group, 其中 Group 1 和 Group 2 最可能的祖先分布是法国(O), 概率分别是 61.27%和 65.50%; Group 3 和 Group 4 最可能的祖先分布是印度(I), 概率分别是

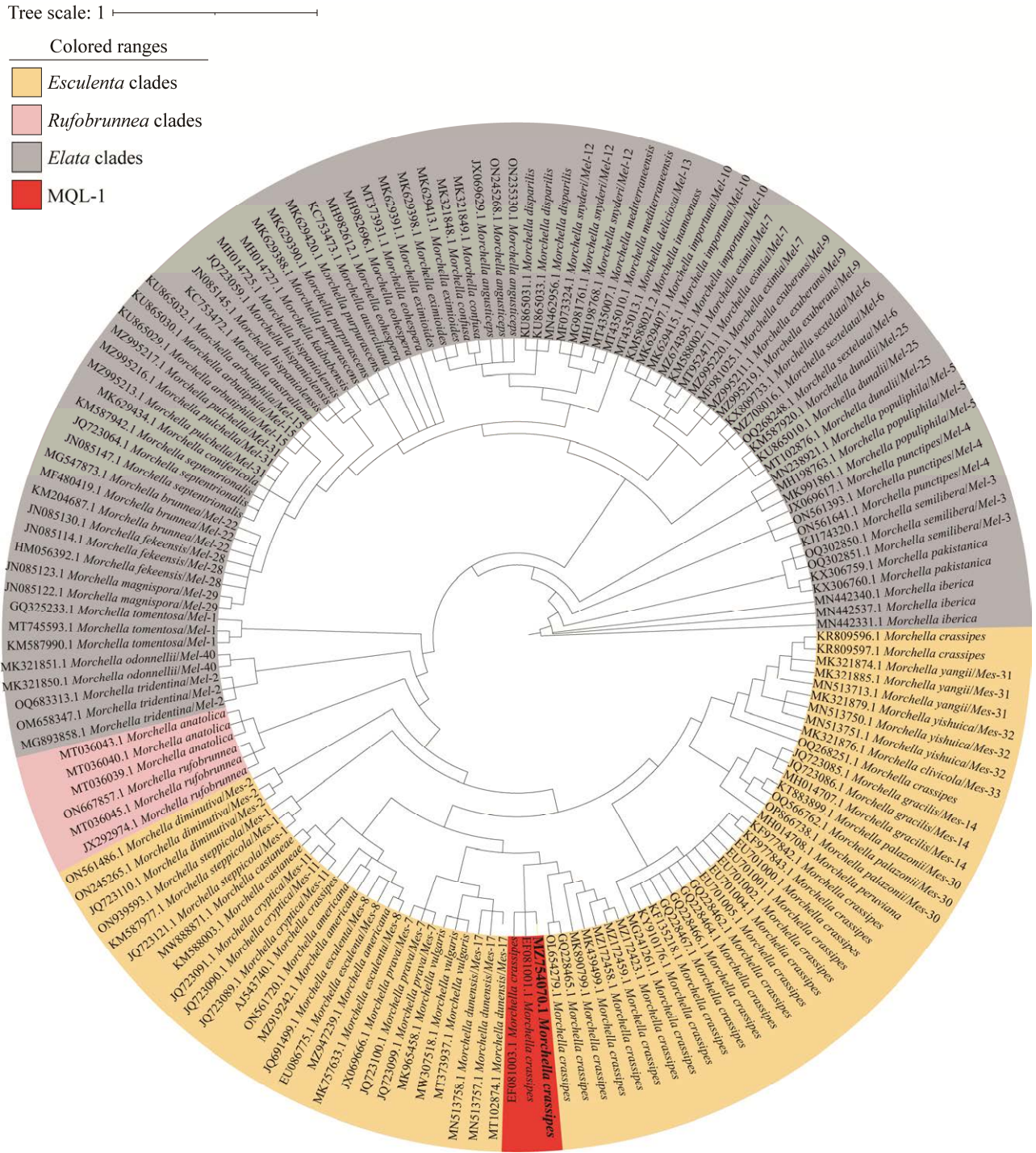


图 2 菌株 MQL-1 基于 ITS 序列构建的贝叶斯系统发育树 比例尺 1 表示 1 000 个核苷酸有 100 个被替代；本研究所获序列用黑色粗体红色背景突显

Figure 2 Bayesian inference phylogenetic analyses of the strain MQL-1. The tree scale 1, represented a hundred out of 1 000 nucleotides were replaced. The sequences obtained in this study are highlighted with a black bold red background.

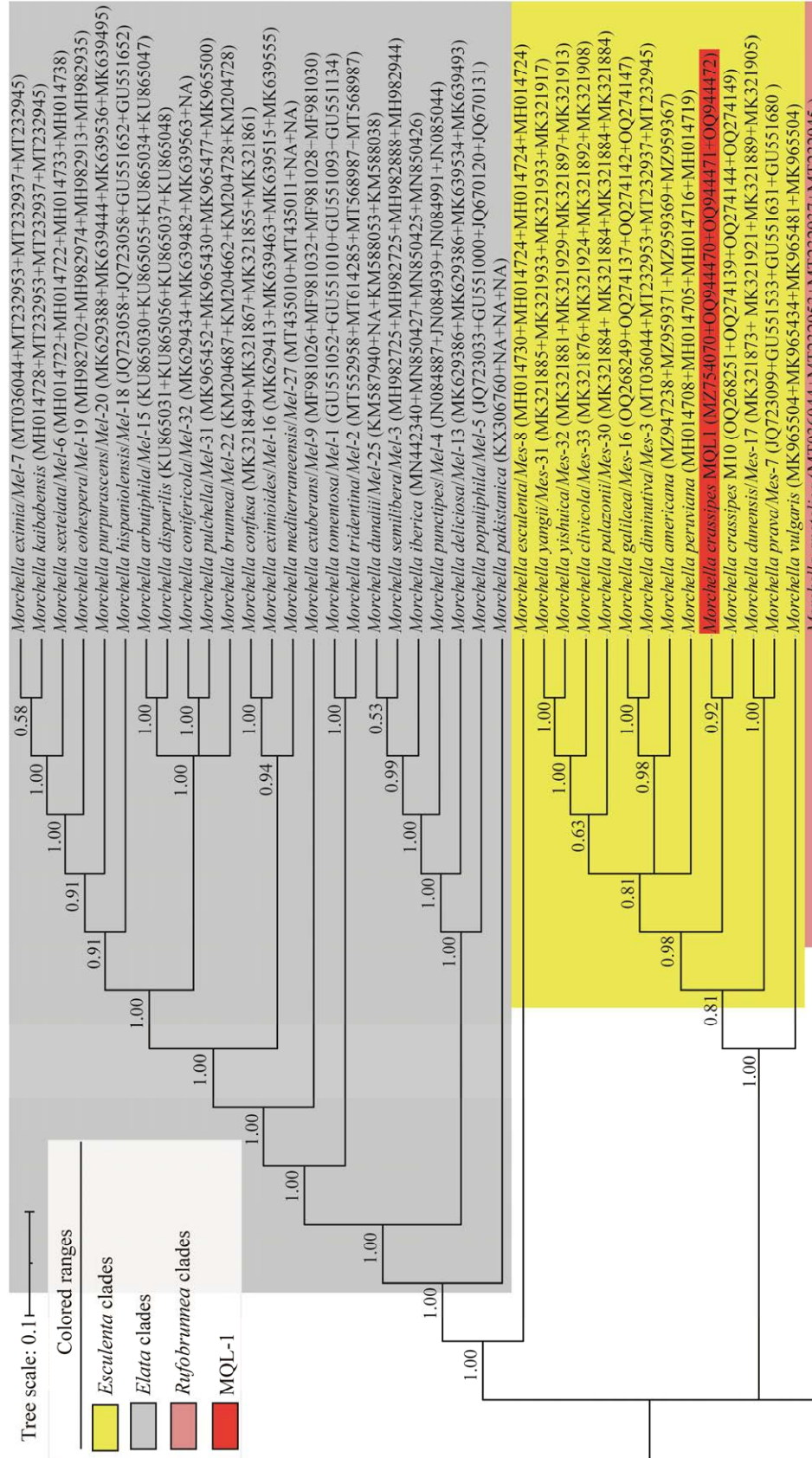


图3 基于4个基因构建的羊肚菌MQL-1贝叶斯系统发育树。以39个羊肚菌系统发育物种的4个基因(ITS+TEF1+RPB1+RPB2)联合序列基于贝叶斯推断法构建的系统发育树。内部节点的统计数值为贝叶斯所得的自举支持率。物种GenBank登录号顺序为ITS+TEF1+RPB1+RPB2, 其中“NA”表示无GenBank登录号。比例尺0.1表示100个核苷酸有10个被替代。本研究所得序列用红色突出。

Figure 3 The phylogenetic tree of the *Morchella* strain MQL-1 based on four genes. The phylogenetic tree was constructed based on Bayesian inference using a combined sequence matrix of 4 genes (ITS+TEF1+RPB1+RPB2) from 39 *Morchella* phylogenetic species. Numbers above branches are bootstrap values. The order of GenBank accession number is 5.8s-ITS+TEF1+RPB1+RPB2, and the “NA” indicates that no GenBank accession number. The tree scale 0.1, represented ten out of 100 nucleotides were replaced. The strains obtained in this study are highlighted in red.

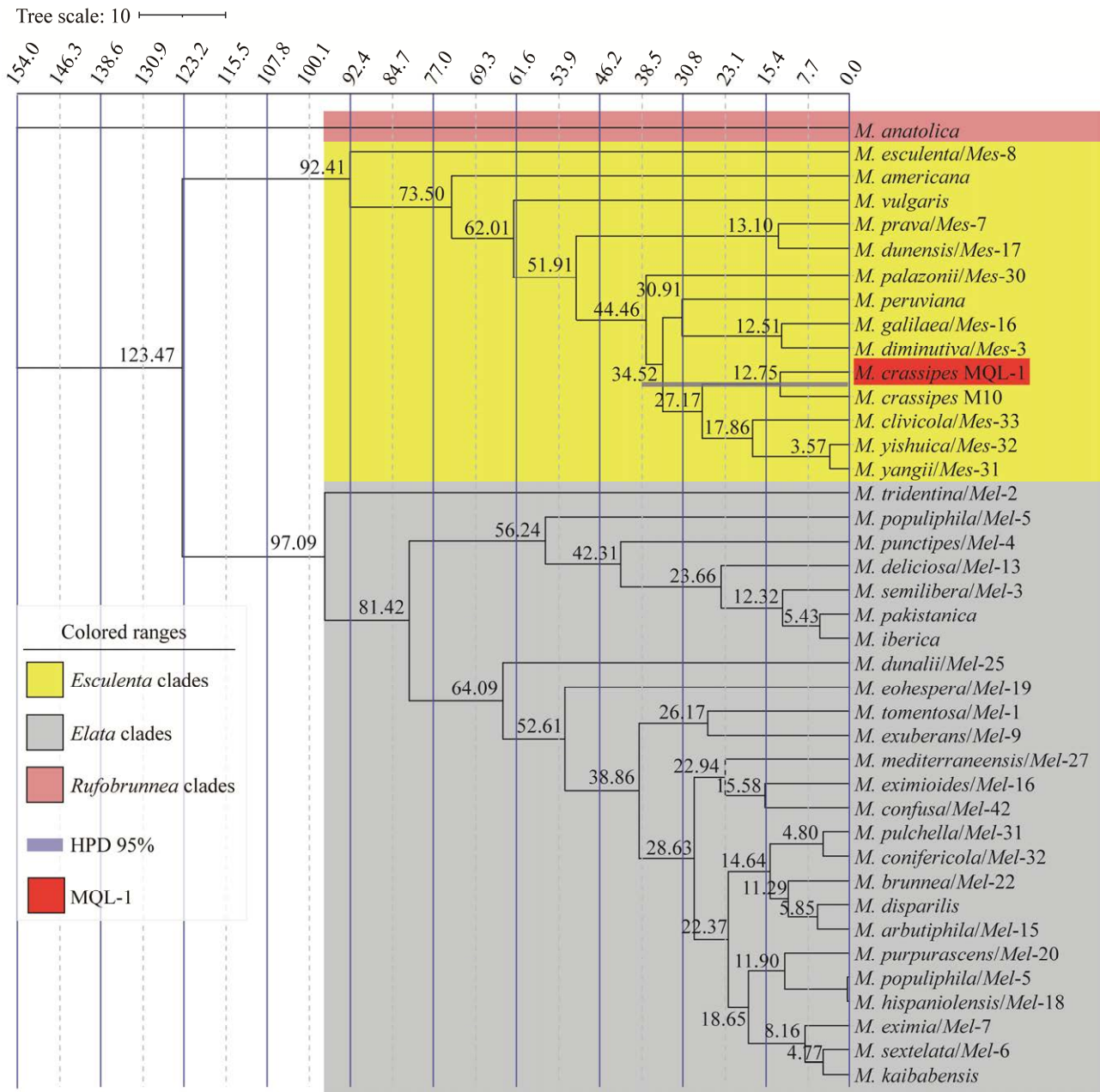


图 4 菌株 MQL-1 系统发育时间树 树的拓扑结构来自于 39 个羊肚菌物种基于 4 个基因(ITS+TEF1+RPB1+RPB2)联合序列的 BEAST 分析结果. 节点中间数字表示该节点的分化时间, 蓝色线段为该节点 95%置信区间, 比例尺 10 表示 10 000 个核苷酸有 1 000 个被替代. 本研究所获菌株用红色突显

Figure 4 Divergence time estimation of the strain MQL-1. The tree topology was derived from BEAST analysis of 39 *Morchella* phylospecies based on the combined sequences of 4 genes (ITS+TEF1+RPB1+RPB2). The middle digit of a node indicates the differentiation time of the node. The blue line segment represents the 95% highest posterior density of this node. The tree scale 10, represented a thousand out of 10 000 nucleotides were replaced. The strains obtained in this study are highlighted in red.

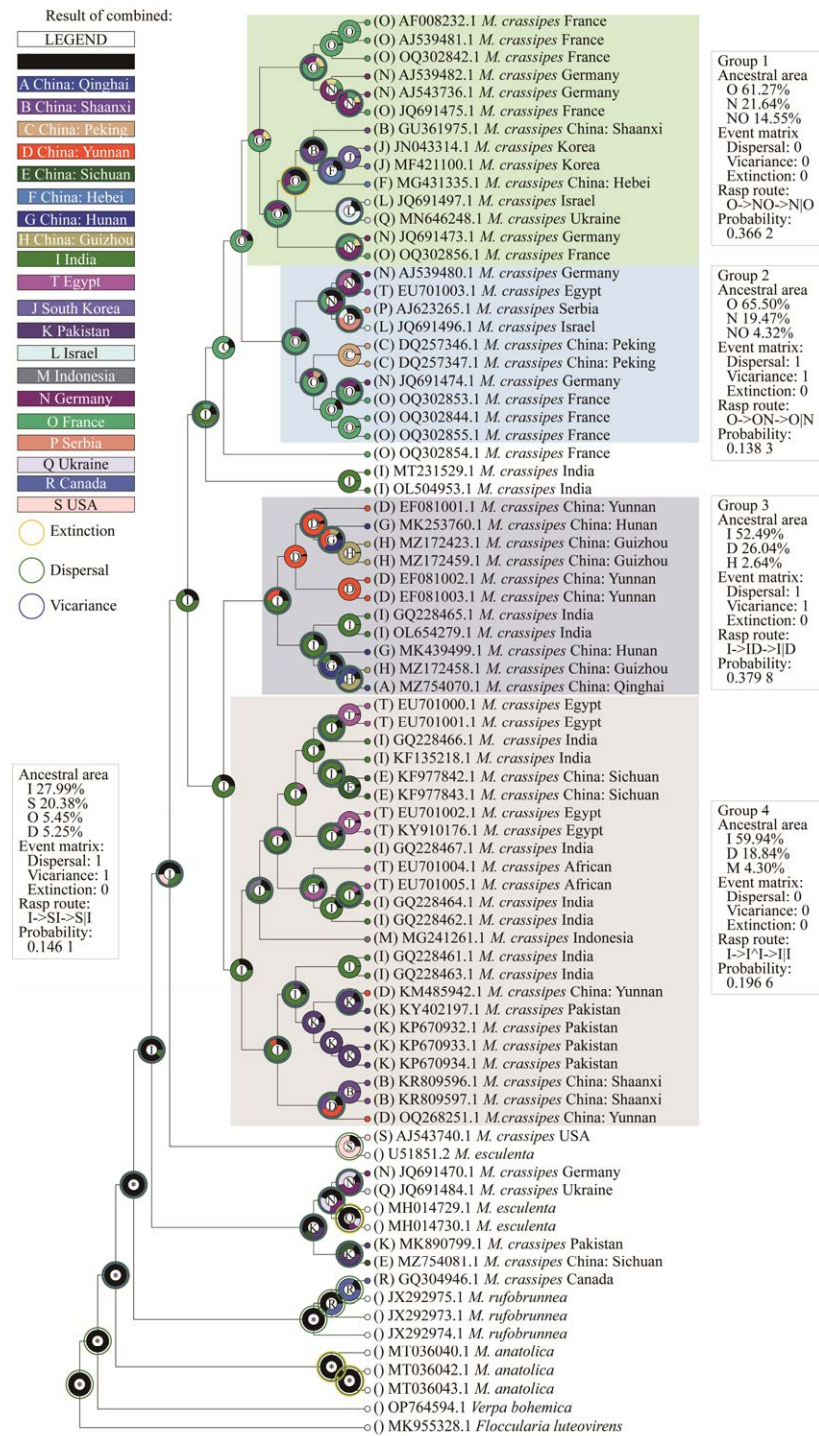


图5 粗柄羊肚菌 Bayesian Binary MCMC 法分析推测的溯祖树 每个节点的饼状图显示了可能的祖先分布. 圆形图上的绿色圆圈表示可能的扩散事件, 蓝色圆圈表示可能的变异事件, 黄色圆圈表示可能的灭绝事件

Figure 5 Geographic range evolution of *Morchella crassipes* by Bayesian Binary MCMC method. The pie chart for each node shows the possible ancestry distribution. Green circles, blue circles, and yellow circles on the circle plot represent possible dispersal events, possible vicariance events, and the possible extinction events, respectively.

52.49%和 59.94%。青海祁连粗柄羊肚菌 MQL-1 在 Group 3 中, 其最可能的祖先分布区是印度 (I, 52.49%), 其次是中国云南(D, 26.04%)。

3 讨论与结论

本研究利用基础形态学和分子生物学的方法将青海祁连野生羊肚菌鉴定为粗柄羊肚菌 *M. crassipes* (Vent.) Pers., 该物种广泛分布于我国的西北、东北和华北等地, 包括青海、甘肃、陕西、新疆、湖北、山东、四川、吉林、辽宁、黑龙江、内蒙古、河南和江苏等地^[9]。宏观形态和发育特征已被证明在羊肚菌中具有分类学价值, 例如子囊果从浅色到深色的成熟过程, 不育脊的方向和变暗(或不变暗)过程, 凹坑的形状和排列, 菌柄颜色、菌盖与菌柄的连接等^[3]。青海祁连粗柄羊肚菌菌株 MQL-1 子囊孢子大小为 $(21.17 \pm 4.33) \mu\text{m} \times (14.26 \pm 3.25) \mu\text{m}$; 秦皇岛粗柄羊肚菌菌盖淡黄色, 长 4–10 cm, 菌柄白色, 长 3.5–9.5 cm^[18]; 秦岭地区粗柄羊肚菌菌盖约 7 cm, 菌柄约 3–8 cm, 可培养菌丝为辐射状生长^[19]; 山西娄烦县粗柄羊肚菌子囊孢子呈椭圆形, 其宽为 12–13 μm , 长 $(24–26) \mu\text{m}$ ^[20]; 云南粗柄羊肚菌子囊孢子一般呈椭圆形, 两端钝圆; 郑州粗柄羊肚菌大小约为 $(13.0–15.3) \mu\text{m} \times (21.5–24.0) \mu\text{m}$ ^[21]。大型真菌子囊果的形成与发育, 受温度、湿度、光照和空气等环境条件以及相应营养条件影响外, 也受其特有的遗传因子控制, 羊肚菌子囊孢子成熟晚且不均匀, 干燥标本的测量结果通常不可靠^[22]。另外, 羊肚菌子囊果的形状、大小等形态特征环境随气候等外界条件和个体发育的改变而发生较大变化, 而且大多数羊肚菌属物种的形态学描述仍然缺乏更新, 单一的传统形态学分类很难对其进行准确的分类鉴定^[23]。多基因谱系一致性系统发育学物种识别法为羊肚菌的分类研究提供了新的思路, 基于此, 获得

了青海祁连粗柄羊肚菌 MQL-1 的 5 个基因片段, 多基因系统发育分析结果与形态学鉴定结果一致。本研究结果为青海粗柄羊肚菌提供了基础形态学特征数据, 青海省羊肚菌物种多样性丰富, 仍需加强羊肚菌资源分类研究, 丰富青海省野生羊肚菌多样性的菌种资源库信息。

青海祁连粗柄羊肚菌 MQL-1 与云南粗柄羊肚菌 M10 的分化时间在 12.75 Mya, 该分化事件在祁连山脉第 3 次隆升事件时间范围内。古地质事件表明, 祁连山脉在 61.9–41、39.2–32、27.9–15 和 12–5 Mya 发生过 4 次重大的隆升或剥露事件^[24], 祁连山脉古地质隆升事件是导致区域内粗柄羊肚菌物种分化的原因之一。物种的演化和区系的分异与物种本身的进化机制、古地理和气候环境等综合因素密切相关, 青藏高原的隆升被认为是全球晚新生代气候变化的重要因素^[25–26]。同时, 祁连造山带处于青藏高原东北缘, 作为特提斯构造域最北部典型的增生型造山带, 在华北克拉通与柴达木地块之间经历了早古生代的俯冲和碰撞的多阶段造山过程, 并于新生代受印度板块与欧亚板块碰撞的远程效应的影响形成了现今的祁连山逆冲断裂带^[27]。青藏高原的特有物种冬虫夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*) 优势寄主分化时间与青藏高原隆起有一定的关联性^[28], 似鲶高原鳅 (*Triplophysa siluroides*) 的分化与青藏高原隆起导致的祁连山脉抬升有密切关系^[29]; 该区域也是尖角小髯甲 (*Gnaptorina acutangula*) 最可能的祖先分布地, 其隆起造成地理屏障阻止该物种扩散和各物种间基因交流^[30]。青海祁连粗柄羊肚菌 MQL-1 在中新世(距今 1 500 万–1 200 万年) 与云南的粗柄羊肚菌 M10 产生分化, 暗示祁连山脉第三次隆升形成并发展羊肚菌物种, 祁连造山带在古地质时期为羊肚菌物种分化和扩散提供了可能的避难所。

REFERENCES

- [1] LOIZIDES M, ALVARADO P, CLOWEZ P, MOREAU PA, OSA LR, PALAZÓN A. *Morchella tridentina*, *M. rufobrunnea*, and *M. kakiicolor*: a study of three poorly known Mediterranean morels, with nomenclatural updates in section *Distantes*[J]. *Mycological Progress*, 2015, 14(3): 1-18.
- [2] 乔俊, 李紫薇, 何宪波, 李经纬, 赵建国, 岳嘉欣, 杜楠. 山西地区野生羊肚菌生境调查与分子鉴定[J/OL]. 分子植物育种, 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230328.1247.012.html>.
- QIAO J, LI ZW, HE XB, LI JW, ZHAO JG, YUE JX, DU N. Habitat Investigation and Molecular Identification of *Morchella* in Shanxi[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230328.1247.012.html> (in Chinese).
- [3] LOIZIDES M, ALVARADO P, MOREAU PA, ASSYOV B, HALASŮ V, STADLER M, RINALDI A, MARQUES G, ZERVAKIS GI, BOROVIČKA J, VOOREN N, GREBENC T, RICHARD F, TAŠKIN H, GUBE M, SAMMUT C, AGNELLO C, BARONI TJ, CROUS P, FRYSSOULI V, et al. Has taxonomic vandalism gone too far? A case study, the rise of the pay-to-publish model and the pitfalls of *Morchella* systematics[J]. *Mycological Progress*, 2022, 21(1): 7-38.
- [4] LOIZIDES M, GONOU-ZAGOU Z, FRANSUAS G, DRAKOPOULOS P, SAMMUT C, MARTINIS A, BELLANGER JM. Extended phylogeography of the ancestral *Morchella anatolica* supports preglacial presence in Europe and Mediterranean origin of morels[J]. *Mycologia*, 2021, 113(3): 559-573.
- [5] 乔婷. 延安南部地区野生羊肚菌系统发育分析及优良菌种选育[D]. 延安: 延安大学硕士学位论文, 2022.
- QIAO T. Phylogenetic analysis of wild *Morchella* in southern Yan'an and breeding of excellent strains[D]. Yan'an: Master's Thesis of Yan'an University, 2022 (in Chinese).
- [6] DU XH, WU DM, HE GQ, WEI W, XU N, LI TL. Six new species and two new records of *Morchella* in China using phylogenetic and morphological analyses[J]. *Mycologia*, 2019, 111(5): 857-870.
- [7] 武冬梅, 李先义, 高能, 李全胜. 采用多基因联合方法鉴定新疆野生羊肚菌[J]. 分子植物育种, 2022, 20(7): 2420-2427.
- WU DM, LI XY, GAO N, LI QS. Taxonomic identification of wild *Morchella* in Xinjiang based on multigene[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(7): 2420-2427 (in Chinese).
- [8] DU XH, ZHAO Q, YANG ZL. A review on research advances, issues, and perspectives of morels[J]. *Mycology*, 2015, 6(2): 78-85.
- [9] 贺新生, 张锐杰, 李小勇, 王亚洲, 朱晓琴, 周莉. 中国羊肚菌属种类及名称[J]. 食用菌, 2021, 43(1): 11-14.
- HE XS, ZHANG RJ, LI XY, WANG YZ, ZHU XQ, ZHOU L. Species and names of *Morchella* in China[J]. *Edible Fungi*, 2021, 43(1): 11-14 (in Chinese).
- [10] 刘伟. 梯棱羊肚菌生长发育过程及羊肚菌属的组学研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2020.
- LIU W. Omics on the growth and development of *Morchella importuna* and the *Morchella*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [11] DU XH, ZHAO Q, O'DONNELL K, ROONEY AP, YANG ZL. Multigene molecular phylogenetics reveals true morels (*Morchella*) are especially species-rich in China[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2012, 49(6): 455-469.
- [12] 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.
- DU XH, ZHAO Q, YANG ZL. Diversity, evolutionary history and cultivation of morels: a review[J]. *Mycosystema*, 2014, 33(2): 183-197 (in Chinese).
- [13] O'DONNELL K, ROONEY PA, MILLS LG, MICHEAL Kuo, WEBER NS, REHNER SA. 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*, 2011, 48(3): 252-265.
- [14] CHEN JJ, CUI BK, ZHOU LW, KORHONEN K, DAI YC. Phylogeny, divergence time estimation, and biogeography of the genus *Heterobasidion* (Basidiomycota, Russulales)[J]. *Fungal Diversity*, 2015, 71(1): 185-200.
- [15] ZHU L, SONG J, ZHOU JL, SI J, CUI BK. Species diversity, phylogeny, divergence time, and biogeography of the genus *Sanguangporus* (Basidiomycota)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 812.
- [16] MENG Q, XIE ZL, XU HY, GUO J, TANG YP, MA T, PENG QQ, WANG B, MAO YJ, YAN SJ, YANG JB, DONG DY, DUAN YZ, ZHANG F, GAO TZ. Out of the Qinghai-Tibetan Plateau: origin, evolution and historical biogeography of *Morchella* (both *Elata* and *Esculenta* clades)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1078663.
- [17] 朱琳. 桑黄菌属的分类与系统发育及生物地理学研

- 究[D]. 北京: 北京林业大学博士学位论文, 2018.
- Zhu L. Taxonomy, phylogeny and biogeography of *Sanghuangporus* (Hymenochaetales, Basidiomycota)[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing Forestry University, 2018 (in Chinese).
- [18] 和晓娜. 秦岭中东部地区羊肚菌的分类鉴定及生物学特性研究[D]. 西安: 陕西师范大学硕士学位论文, 2012.
- HE XN. Taxonomic identification and biological characterization of *Morchella* from the middle and eastern part of the Qinling Mountains[D]. Xi'an: Master's Thesis of Shaanxi Normal University, 2012 (in Chinese).
- [19] 吴国定, 张昕艳. 羊肚菌菌丝形态观察[J]. 山西农业科学, 1993(1): 2.
- WU GD, ZHANG XY. The hypha morphology of *Morchella esculenta* on culture condition[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 1993(1): 62 (in Chinese).
- [20] 马绍宾, 牛盼盼, 郭相, 马明. 羊肚菌及其近缘属子囊孢子扫描电镜观察研究[J]. 中国食用菌, 2021, 40(12): 19-25.
- MA SB, NIU PP, GUO X, MA M. Scanning electron microscopic observation on the ascospores of *Morchella* spp. and its closely related genera[J]. Edible Fungi of China, 2021, 40(12): 19-25 (in Chinese).
- [21] 刘伟, 蔡英丽, 何培新, 张亚, 边银丙. 粗腿羊肚菌子囊孢子萌发过程及其细胞核行为[J]. 食用菌学报, 2017, 24(1): 18, 20, 2.
- LIU W, CAI YL, HE PX, ZHANG Y, BIAN YB. Processes of ascospore germination and its cytosolic behavior in the *Morchella crassipes*[J]. Journal of Edible Mushrooms, 2017, 24(1): 18, 20, 2 (in Chinese).
- [22] 郝哲, 张彦飞, 高升成, 梁海燕, 李惠霞, 李红, 思瑞琳. 野生羊肚菌资源收集与菌株筛选技术研究[J]. 中国食用菌, 2022, 41(9): 16-25.
- HAO Z, ZHANG YF, GAO SC, LIANG HY, LI HX, LI H, SI RL. Research on the wild resources collection and strain screening of *Morchella* spp.[J]. Edible Fungi of China, 2022, 41(9): 16-25 (in Chinese).
- [23] 赵建俊, 吉建成, 于国民, 董相军, 徐丽丽. 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.
- ZHAO JJ, JI JC, YU GM, DONG XJ, XU LL. Identification of several strains of wild *Morchella* spp. in Shandong Province[J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(12): 28-32 (in Chinese).
- [24] 陈立豪. 西宁盆地及祁连山东段低温热年代学记录的中-新生代构造事件[D]. 兰州: 兰州大学博士学位论文, 2022.
- CHEN LH. Low-thermochronology constraints the Mesozoic tectonic events from the Xining basin and eastern Qilian Shan[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Lanzhou University, 2022 (in Chinese).
- [25] SHI YF, LI JJ, LI BY. Uplift and Environmental Changes of Qinghai-Tibetan Plateau in the Late Cenozoic[M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 1998.
- [26] 代永东. 青藏高原东南部冬虫夏草及其近缘种分类与谱系地理研究[D]. 昆明: 云南大学博士学位论文, 2018.
- DAI YD. Taxonomy and biogeography of *Ophiocordyceps sinensis* and its relatives in southeastern Qinghai-Tibetan Plateau[D]. Kunming: Doctoral Dissertation of Yunnan University, 2018 (in Chinese).
- [27] 李冰. 祁连造山带早古生代构造演化与新生代陆内生长变形研究[D]. 北京: 中国地质科学院博士学位论文, 2020.
- LI B. Study on the early Paleozoic tectonic evolution and cenozoic intracontinental development of the Qilian Orogenic belt[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Geological Sciences, 2020 (in Chinese).
- [28] DAI YD, WU CK, WANG YB, WANG Y, HUANG LD, DANG XJ, MO XX, ZENG PS, YANG ZL, YANG DR, ZHANG CM, LEMETTI P, YU H. Phylogeographic structures of the host insects of *Ophiocordyceps sinensis*[D]. Zoology, 2019, 134: 27-37.
- [29] 张芬. 祁连山地区高原鳅属系统发育关系及生物地理学研究[D]. 兰州: 兰州大学博士学位论文, 2017.
- ZHANG F. Phylogeny and biogeography of *Triplophysa* (Nemacheilinae: Cypriniformes) of the Qilian mountains area[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Lanzhou University, 2017 (in Chinese).
- [30] 李秀敏. 青藏高原琵琶甲族部分属的系统发育与历史生物地理学[D]. 保定: 河北大学博士学位论文, 2020.
- LI XM. Phylogenetic and historical biogeography of some genus of chrysoptera in Qinghai-Xizang Plateau[D]. Baoding: Doctoral Dissertation of Hebei University, 2020 (in Chinese).