

# 羊肚菌属分子系统学研究进展\*

胡克兴 董雪 范黎\*\*

(首都师范大学生物系 北京 100037)

**摘要:** 简要介绍羊肚菌属系统学研究现状, 概述了当前国内外羊肚菌属分子系统学研究进展。

**关键词:** 羊肚菌属, 分子系统学, 进展

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0115-05

## The Advances of Molecular Systematics on *Morchella*\*

HU Ke-Xing DONG Xue FAN Li\*\*

(Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037)

**Abstract:** This article provides a brief description of systematics on *Morchella*, and reviews the advances of molecular systematics on *Morchella* over the world.

**Key words:** *Morchella*, Molecular systematics, Advances

羊肚菌属 *Morchella* 隶属于子囊菌亚门 Ascomycotina 盘菌目 Pezizales 羊肚菌科 Morchellaceae。该属成员是野生名贵食(药)用真菌, 最早收录于李时珍的本草纲目。从 Boudier (1897) 以来菌物学家针对羊肚菌属分类作了大量的研究工作, 但至今在该领域内仍然存在诸多的分歧。近年来随着分子生物学技术的应用, 羊肚菌的遗传学和系统学研究取得了快速发展。传统的生态学、形态学等方法与分子生物学研究方法的结合应用, 为羊肚菌属系统学研究提供了新的思路、新的发展平台。

### 1 羊肚菌属的传统种类鉴定

特征是指某一有机体的任何属性和特色, 是构建系统树的基础。菌物学家使用许多不同的特征来进行系统学研究, 包括形态、解剖、超微结构、生物化学、核酸序列和其他各种属性。传统的羊肚菌属系统学研究主要依据羊肚菌的生态学 and 形态学特征进行种类鉴定和系统树构建。其中包括子实体形态观察、菌丝的显微特征以及子囊、子囊孢子、菌核和侧丝形态的观察。很早以前菌物学家就对羊肚菌的基本形态有了较为全面的了解和认识, 为羊肚菌的系统学研究奠定了良好的基础。据 Emile Jaquetant 在《Le Morilles》一书中报道羊肚菌属共有 28 个种, 分布于法国、德国、美国、印度、中国等地<sup>[1]</sup>。戴芳澜等<sup>[2]</sup>《中国真菌总汇》记载, 已知羊肚菌属菌物在中国有 8 个种: 小顶羊肚菌 *M. angusticeps* (Peck) Boudier; 尖顶羊肚菌 *M. conica* (Pers.) Boudier; 粗柄羊

\* 北京市自然科学基金 (No.6032005)

北京市教育委员会 (00KJ-096)

北京市委组织部优秀人才培养专项经费资助项目

\*\* 联系人 Tel: 010-68902964, E-mail: clifan@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2004-02-31, 修回日期: 2004-07-02

肚菌 *M. crassipes* (Krombh.) Boudier; 小羊肚菌 *M. deliciosa* (Fr.) Jet; 开裂羊肚菌 *M. dilatans* (Fr.) Boudier; 高羊肚菌 *M. elata* (Fr.) Boudier; 羊肚菌 *M. esculenta* Pers. ex St. Amans; 硬羊肚菌 *M. rigida* Jet。刘正南在青海发现庭园羊肚菌 *M. horitensis* Boudier; 王法渠在甘肃迭部发现离柄羊肚菌 *M. semilibera* Fr.。这些羊肚菌种类主要分布在云南、甘肃、湖南、四川、青海、河南、河北、黑龙江、辽宁、宁夏、新疆、江苏等地。Groves 和 Hoare (1953)、Rifai (1968)、Weber (1988) 等人在自己观察研究的基础上提出了多态种的概念, 将羊肚菌属分为三个多态种群: 离柄羊肚菌 *M. semilibera*、黑羊肚菌 *M. elata*, *M. angusticeps* 和羊肚菌 *M. esculenta*, *M. deliciosa*<sup>[3]</sup>。Leonard、O'Donnell *et al.* (1996)、Bunyard *et al.* (1996) 在后来针对羊肚菌 28S rDNA 所进行的分子性状研究工作为 Groves 等人的这个分类概念提供了大量的分子性状依据。

## 2 羊肚菌属分子系统学研究

传统的菌物分类主要依据菌物的形态特征, 不同的学者采用不同的性状不同的方法, 而且少数形态特征和生理生化指标随着环境的变化而不稳定。因此, 在传统的菌物分类中常引起分类系统的不稳定或意见分歧。随着生物化学、遗传学以及分子生物学等相关学科的发展, 同时也是菌物分类学自身发展的客观需求, 在菌物的现代分类学中已引入了分子生物学技术。例如核酸分子杂交技术、聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术、限制性长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP)、随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)、电泳核型分析、核酸序列分析、同工酶分析以及蛋白质免疫技术等。不同的研究者可根据具体的实验对象和目的, 选择相应的技术手段<sup>[4]</sup>。国内外学者在羊肚菌分子系统学研究中主要应用核酸分析、同工酶分析、蛋白质免疫分析技术等。大量分子性状研究数据如核酸序列同源性、酶谱的相似系数和酶谱距离、免疫学差异的获得为羊肚菌系统学研究提供了最直接的证据。

**2.1 核糖体 DNA 分析** 分子系统学研究的基本方法之一是对一定 DNA 序列进行同源性比较, 构建系统树, 以此探讨它们的系统演化关系。核糖体 DNA 分子进化信息量大, 趋同性小, 可比性强, 已被广泛选作生物发育系统学的分子指标, 也是系统发育物种概念界定的依据之一。羊肚菌基因组特定核糖体 DNA 可由特定的引物进行 PCR 扩增获得, 并进行进一步的测序分析。为了从分子水平研究羊肚菌属真菌的分类和系统发育地位, 菌物学家们已对羊肚菌属的核糖体 DNA 序列作了大量研究。

Bunyard, Nicholson 和 Boyse 等<sup>[5]</sup>对羊肚菌属、钟菌属 *Verpa*、皱盘菌属 *Disciotis* 和与它们亲缘关系很近的鹿花菌属 *Gyromitra* 的 28SrDNA 进行 PCR 扩增, 对扩增产物的分析发现存在着限制性片段长度多态性 (RFLP), 并可由此推断出它们的种系发生关系。28S rDNA 5' 端比 3' 端具有更丰富的多态性。根据 RFLP 结果分析, 分离的 3 个尖顶羊肚菌与其它羊肚菌的差异分别为 0.5%、1.0% 和 1.5%, 而鹿花菌属与羊肚菌属的差异约为 6.2%。在某些情况下, 种内比种间存在更多的遗传多样性。该结果为羊肚菌属只有几个 (可能是 3 个) 多态种的假说提供了进一步的证据。

核糖体上的基因多为多拷贝、中度重复序列, 一个重复单位中 ITS 区位于 18S 和 28S 基因之间, 中部被 5.8 S 基因一分为二, 即 ITS1 区和 ITS2 区。5.8 S、18 S、28 S 进化速率慢, 常用于探讨科级和科级以上等级的系统发育问题。而 ITS 区进化速率较编码

区快,一般用于研究较低等级如属间、种间甚至居群间的系统关系<sup>[6,7]</sup>。Buscot *et al.* 对羊肚菌属的 ITS 多态性进行了研究,结果表明羊肚菌和尖顶羊肚菌的 ITS 长度分别在 740~750 bp 和 1150~1220 bp 之间<sup>[8]</sup>。Daniel Wipf 等人对羊肚菌 (*M. esculenta*)、尖顶羊肚菌 *M. conica* 的完整 ITS 序列进行了测序分析。研究中发现,羊肚菌和尖顶羊肚菌二者的 ITS 序列存在长度差异。同时发现 5.8 S 区有着很大的同源性,而 ITS1 和 ITS2 片段间存在很高的多态性<sup>[9]</sup>。传统的 DNA 限制性片段长度多态性研究方法无论是核 DNA、线粒体 DNA,还是核糖体 DNA,都有一个共同的局限性,即不仅需要大量相当纯的 DNA 样品,而且 DNA 杂交膜和探针的准备,以及杂交过程都相当耗时耗力,同时由于探针的异源性而引起的杂交低信噪比或杂交膜的背景信号太高等都会影响杂交的灵敏度。PCR 技术与 RFLP 方法的结合使用常被称为 PCR-RFLP,恰好克服了上述缺点,实现了不需杂交和无需放射性标记的 RFLP 分析。同时由于 PCR 技术的引入,使人们可以按自己的目的随意针对生物体 DNA 的不同区段进行研究,酶切图谱也易于分析,这就使对生物体多态性的分析变得简捷快速。这一方法在真菌系统学的研究中占有相当的比重<sup>[2]</sup>。Daniel Wipf, Anne Fribourg 等人用 PCR-RFLP 技术对羊肚菌科的 11 个种的 ITS 序列进行了较为全面的研究。通过采用最大简约法 (maximum parsimony) 和邻接法 (neighbour joining) 进行分析,可以很明确的将黄羊肚菌和黑羊肚菌区分开。在采用最大简约法分析构建的系统树中可以看出,黄羊肚菌中的 *M. esculenta* 与 *M. vulgaris* Boundier 完全相同,黑羊肚菌中的 *M. conica* 可以容易地与 *M. angusticeps* 和 *M. elata* 区分开来,而后两者的同源性更高、遗传关系更为接近。在采用邻接法分析构建的系统树中得到的各种羊肚菌的遗传关系与上述结果基本吻合<sup>[10]</sup>。很明显,对 ITS 的限制性长度多态性研究和测序分析是解决羊肚菌系统学研究中的未定问题的有效工具。另外, rDNA 的重复单位间的基因间区 (IGS) 或称为非编码区 (NTS) 与 ITS 一样有着很快的进化速率,在近缘类群间的系统学研究、杂交研究及居群遗传学研究上具有一定的应用潜力<sup>[11]</sup>。Buscot *et al.* 分别对多种羊肚菌的 ITS 和 IGS 序列进行了 PCR/RFLP 分析,其结果证明二者在羊肚菌的系统学研究中都有着一定的应用价值。ITS 区的 PCR/RFLP 分析可以清楚地将 5 个研究组群 *Verpa*、*M. conica* 和 *M. angusticeps*; *Mitrophora*; *Gyromitra esculenta*; *Disciotis venosa*; *M. esculenta* 和 *M. crassipes* 区分开。IGS 区的 PCR/RFLP 分析只能有效的将亲缘关系非常接近的 *M. crassipes* 和 *M. esculenta* 区分开。这表明 IGS 区只能用于遗传距离较近种或是种内的一些亲缘关系鉴定,而 ITS 区的应用范围则大得多<sup>[8]</sup>。这些工作为羊肚菌系统学研究做出了重要贡献,提供了重要依据。

**2.2 同工酶分析** 在生物的进化过程中,变异基因经复制分离形成了不同位点基因,从而编码同工酶等蛋白质的不同亚基,因此同工酶是基因变异的产物,是识别遗传基因存在的标记。对有机体 DNA 的转录翻译的直接产物-“同工酶”的研究在获取分子水平的资料、探索生物居群的遗传学结构、研究生物遗传多样性和系统与进化生物学的工作中将起到重要作用<sup>[12]</sup>。

同工酶电泳分析较早前已成功的应用于真菌系统学研究。Daniel Wipf, Jean-Philippe 等人对分别来自于欧洲、美国、以色列等地的不同羊肚菌菌株进行了同工酶分析,研究中对下列酶进行了同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳分析:谷氨酸合成酶, NAD-谷氨酸脱氢酶, NADP-谷氨酸脱氢酶,天冬氨酸转氨酶,苹果酸脱氢酶, NAD-磷酸甘油醛脱氢酶,磷酸葡萄糖异构酶,过氧化物歧化酶等,采用 WinCam 2.0 软件对电泳结果分析得出

酶电泳迁移率 ( $R_f$ )。通过对酶迁移率的分析可以得到其系统发生信息。Daniel Wipf 的研究证实了羊肚菌在种内和种间水平上存在着较高的同工酶遗传变异, 可以建立一套完整的同工酶分析方法对羊肚菌属进行种间或种内菌株鉴定, 证实了同工酶分析在羊肚菌属系统学研究中的应用价值。因此, W Daniel 等人认为将同工酶电泳分析应用到羊肚菌研究中有利于进一步改进完善羊肚菌属的系统学研究工作<sup>[13]</sup>。龙海正等人研究发现羊肚菌不同子实体菌株及同一子实体不同单孢菌株间的酯酶同工酶酶谱基本相同, 子实体与菌丝体均具有稳定的 9 条酶带。陈国梁等人对陕北南泥湾 3 种野生羊肚菌 ( $M_{延-1}$ 、 $M_{延-4}$ 、 $M_{延-5}$ ) 的纯化菌丝体及一种四川羊肚菌 ( $M_{延-4}$ ) 菌丝体酯酶同工酶进行了研究。依据王中仁酶谱分析法, 可初步认为  $M_{延-1}$ 、 $M_{延-4}$ 、 $M_{延-5}$  的酯酶分别为不同的基因所控制且只有一个基因位点,  $M_{川}$  的酯酶同工酶有三个相应的不同基因位点所控制且 b 带的基因位点与 M1-2 的酯酶基因位点可能相同, 因此二者的亲缘关系较其它两种则较近, 但  $M_{延-1}$ 、 $M_{延-4}$ 、 $M_{延-5}$  及  $M_{川}$  酶带的迁移率、数目差别明显, 属于不同的种, 这与形态学的分类结果相吻合<sup>[14]</sup>。同工酶分析可同形态、生化、遗传等方面结合起来, 对羊肚菌的分类进行综合认证。

**2.3 蛋白质免疫技术的应用** 在过去的 20 年里, 真菌抗原的免疫学研究已经在真菌学的研究领域内得到了广泛的应用。1989 年 Futhrmann *et al.* 对青霉的研究发现酶联免疫吸附分析 (ELISA) 方法可以用来进行准确的种类鉴定。其他的一些学者如 Kirby、Rybicki、Mohamad 等的工作也表明 ELISA 在血清学研究中比别的一些方法有更高的灵敏性和特异性<sup>[15]</sup>。ELISA 也被用来解决一些丝状真菌的分类问题。1990 年 Burdsall *et al.* 用 ELISA 法对蜜环菌属进行了种类区分, 其中抗体产物是在鸡身上获得的。1993 年 S W Jung, R V Gessner 等人将 ELISA 法应用到了羊肚菌的系统学研究中。他们用 ELISA 法对一组 *M. esculenta* 菌株进行免疫关系研究, 并取两株 *M. semilibera* 作为参照。研究工作中将羊肚菌菌丝细胞提取物作为抗原注射到兔子体内, 从而获得抗血清, 然后采用 ELISA 法进行血清学研究分析。ELISA 分析得到的数据基于 Titer 和 Best-Fit Line 两种方法进行分析, 采用平均连接聚类法 (UPGMA) 和 Fitch-Margoliash 算法进行距离建树。结果显示 *M. esculenta* 与 *M. semilibera* 间的免疫学差异为 27%。同时在上述两种方法构建的系统树中我们可以看到, *M. esculenta* 中的那些灰色、褐色、巨型褐色形态的菌株遗传距离非常接近, 很有可能都属于同一种<sup>[15]</sup>。

与此同时 S W Jung, R V Gessner 认为在今后的研究工作中可以利用蛋白质纯化物替代菌丝细胞提取物作为抗体对羊肚菌属进行免疫学研究, 这样可以更好地揭示羊肚菌各种群间的免疫学关系和系统发育关系, 从而进一步解决羊肚菌系统学研究中的一些问题。

**2.4 羊肚菌属分子系统学研究展望** 目前的羊肚菌属分子系统学研究所获得的系统发育关系, 仍然是探索羊肚菌属物种起源与进化的一种途径, 与自然分类的最高目标还有相当大的差距。随着分子生物学中一些重大问题的解决, 构建羊肚菌属系统谱系将会有更加有力的手段。但要真正构建羊肚菌系统发生的图谱, 应使用综合的方法即分子系统学和形态学、生态学、生物地理学等方法, 在新的计算方法和计算工具支持下相互兼容, 这需要相当多的工作。

## 参 考 文 献

[1] Jacquetant E. Les Morilles La Bibliotheque des Arts paris, 1984.

- [2] 戴芳澜著. 中国真菌总汇. 北京: 科学出版社, 1979. 238.
- [3] Robert V G. *Can J Bot*, 1995, **73** (suppl. 1): 967 ~ 972.
- [4] 刘淑艳, 李玉. 吉林农业大学学报, 2000, **22** (3): 47 ~ 51.
- [5] 陈向东, 朱戎, 兰进. 食用菌学报, 2002, **9** (2): 56 ~ 61.
- [6] 曾东方. 中国食用菌. 1998, **18** (2): 3 ~ 4.
- [7] 赵志礼, 徐璐珊, 董辉, 等. 植物资源与环境学报, 2000, **9** (2): 5 ~ 054.
- [8] Buscot F, Wipf D. *Mycol Res*, 1996, **100** (1): 63 ~ 71.
- [9] Wipf D, Munch J C, Botton B, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, Sept. 3541 ~ 3543.
- [10] Wipf D, Fribourg A, Munch J C, *et al.* *Can J Microbiol.* 1999, **45**: 769 ~ 778.
- [11] 田欣, 李德铎. 云南植物研究, 2002, **24** (2): 170 ~ 184.
- [12] 王新宇, 梁祖炳, 蒲训, 等. 真菌学报, 1996, **15** (3): 220 ~ 226.
- [13] Wipf D, Philippe J. *Can J Microbil*, 1996, **42**: 819 ~ 827.
- [14] 陈国梁, 高小鹏, 任佳梅. 中国食用菌, 2002, **22** (4): 41 ~ 42.
- [15] Jung S W, Gessner R V, Keudell K C, *et al.* *Mycologia*, 1993, **85** (4): 677 ~ 684.