

块菌属研究概况和重要进展

陈娟^{1,2} 邓晓娟^{1,3} 刘培贵^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所 云南 昆明 650204)

(2. 中国医学科学院药用植物研究所 北京 100193)

(3. 中国科学院研究生院 北京 100094)

摘要: 块菌属(*Tuber* F. H. Wigg.)是一类具有重要经济和生态价值的子囊菌门地下生的外生菌根真菌。因能与多种树木共生而在森林生态系统中占据重要地位,子囊果具独特的香味使其在欧洲市场久负盛名,一直以来,该属颇受国内外学者的广泛关注。本文综述了该属在系统分类学、生态学、生物化学及人工栽培等方面的研究概况和进展,分析了目前研究中存在的问题及尚待解决的主要问题,并提出了针对性的建议。

关键词: 块菌属, 分类学, 遗传学, 生物化学, 人工栽培

Research Status and Significant Progress on the Genus *Tuber*

CHEN Juan^{1,2} DENG Xiao-Juan^{1,3} LIU Pei-Gui^{1*}

(1. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650204, China)

(2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

(3. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Tuber* F. H. Wigg. is an ecologically and economically important ectomycorrhizal ascomycetes that produce subterranean ascomata known as truffles. Some species in this genus are widely appreciated for their organoleptic properties. Their taxonomy, systematics, ecology, biochemistry and cultivation have been studied and great advance have been achieved. In this paper, the research history and recent advance on above aspects were summarized. Also, special proposal for further studies was also commented and recommended.

Keywords: *Tuber*, Taxonomy, Genetics, Biochemistry, Cultivation

块菌(Truffles)是地下真菌的统称,其成员隶属于真菌界的3个主要类群:接合菌门(Zygomycota)的内囊霉目(Endogonales)、子囊菌门(Ascomycota)的盘菌目(Pezizales)和大团囊菌目(Elaphomycetales)以及担子菌门(Basidiomycota)的腹菌类。其中,接合菌门中的块菌被称为“豆块菌”(Pea truffle),子囊菌

门中的块菌被称为“真块菌”(True truffle),担子菌门中的块菌被称为“假块菌”(False truffle)^[1]。在我国西南地区块菌俗称“无娘藤”、“松露菌”、“土菇”、“隔山撬”、“松茅茯苓”、“猪拱菌”、“煤黑”等。本文所研究的块菌是“真块菌”中的一个类群即狭义的块菌类——块菌属(*Tuber* F. H. Wigg.)。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30470011, 30770007); 中国科学院创新工程重要方向性项目(No. KSCX2-YW-G-025); 院长基金资助项目(No. 1022, 1035)和云南省自然科学基金项目(No. 2004C005M)

* 通讯作者: Tel: 86-871-5223056; E-mail: pglu@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2008-10-29; 接受日期: 2009-02-17

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

块菌属于 1729 年建立, 后选模式(Lectotype species)为 *Tuber cibarium* Sibth.: Fr. (= *T. brumale* Vittad.), 分类学上隶属于子囊菌门(Ascomycota)、盘菌目(Pezizales)、块菌科(Tuberaceae), 是一类与温带主要植被建群树种松科(Pinaceae)、壳斗科(Fagaceae)、榛科(Corylaceae)、桦木科(Betulaceae)中的多种树木根系形成共生关系的外生菌根真菌, 产生地下生的子囊果, 即“Truffle”^[2]。该属包含许多经济价值极高的种类, 如黑孢块菌(*T. melanosporum* Vittad.)和意大利白块菌(*T. magnatum* Pico), 在欧洲被誉为“地下黄金”和“上帝的食物”。

该属广泛分布于北半球温带地区, 欧洲、北美、东南亚是其主要分布区。块菌属的主要形态特征是子囊果地下生, 表面光滑或具疣突; 产孢组织中实, 具有白色大理石花纹状菌脉; 子囊含 1~8 个孢子, 随机排列于产孢组织中; 子囊孢子表面具有刺状或蜂窝状网纹^[3]。

1 块菌属分类学研究概况和进展

块菌属分类学研究历史悠久, 欧洲著名的菌物学家 Vittadini(1831)、Tulasne(1851)、Fischer(1938)、Malençon(1938)等以及北美的 Harkness(1899)和 Gilkey(1939)等对欧洲和北美早期的块菌属分类学做出了卓越贡献, 出版了一系列经典的分类学专著, 为后人研究奠定基础^[4-9]。在亚洲, Cooke & Massee(1892)报道印度块菌(*T. indicum* Cooke & Massee)之后的近 100 年间这一地区的块菌属研究基本上没有进展^[10]。上世纪 80 年代, 该属在我国的分布得以确认^[11], 促进了东亚地区尤其是我国块菌属的研究。

经典分类学主要依靠形态解剖特征鉴定。子囊果表面特征, 包被的组成, 子囊孢子的大小、形状和表面纹饰等是该属重要的分类特征。然而这些特征在不同子囊果中常表现出交叉和重叠, 误定或异名现象时有发生。该属自成立起, 全球共描述的种类名称达 240 多个 (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>), 而普遍被接受的约 70 个^[3]。上世纪 90 年代后, Gross(1991)、RiOUSset等(2001)、Ceruti等(2003)对欧洲地区块菌属成员的分类和命名进行了归纳和修订, 确定欧洲分布 32 种^[12-14]; 北美地区该属系统完整的分类学工作也正在进行^[15,16]。近年来, 陈娟等(2007)对我国有记录的块菌属种类作了归纳和总结, 鉴定确认

分布在我国的块菌属种类有 16 种, 包括两个新种即脐凹块菌(*T. umbilicatum* Juan Chen & P.G. Liu)和阔孢块菌(*T. latisporum* Juan Chen & P.G. Liu)^[17]; 两个新记录种, 即凹陷块菌(*T. excavatum* Vittad.)和波氏球孢块菌变种(*Tuber borchii* var. *sphaerosperma* Malençon)^[18], 归并了 4 个种, 即中国块菌(*T. sinense* K. Tao & B. Liu)、台湾块菌(*T. formosanum* H.T. Hu)、喜马拉雅块菌(*T. himalayense* B.C. Zhang & Minter)都作为印度块菌(*T. indicum* Cooke & Massee)的异名, 屑状块菌(*T. furfuraceum* H.T. Hu)作为会东块菌(*T. huidongense* Y. Wang)的异名; 排除了阿地块菌(*T. asa* Tul. & C. Tul.)、喜栎块菌(*T. dryophilum* Tul. & C. Tul.)及臭块菌(*T. foetidum* Vittad.)在我国的分布; 另外有 5 个种, 即斑点块菌(*T. maculatum* Vittad.)、短毛块菌(*T. puberulum* Berk. & Br.)、巨孢块菌(*T. gigantosporum* Y. Wang & Z. P. Li)、西藏块菌(*T. xizangense* A. S. Xu)及少孢块菌[*T. oligospermum* (Tul. & C. Tul) Trappe]因没有观察到标本而存疑, 有待进一步研究和证实^[19]。

通过对块菌属的研究, 笔者发现该属分类鉴定中还存在种间关系不明, 形态相似的或者描述相似的种的区分及如何界定一个种的变异范围等难题。这些问题的解决需靠收集大量的来自不同国家、不同地域的标本对比研究, 图文并茂地详细描述每一个种的特征, 同时还要依靠分子生物学等现代研究手段来寻找更多更可靠的分类证据。新近的研究表明, 东亚尤其是我国的块菌属资源丰富且独特, 尚存在大量的未被发现或描述的新分类群, 许多已知种类虽然与欧洲和北美的种类非常相似, 但却有其自身的分布范围。因此, 大量的资源调查和针对中国这一地区的块菌属系统完整的分类描述工作有待加强。

2 分子系统学及生物地理学研究

Lanfranco 等(1993)最早将分子生物学的方法应用于块菌属的研究, 利用随机扩增多态 DNA (RAPD) 标记区分了 6 种形态相似的种^[20]。此后发展出利用核基因组的 ITS、 β -tubulin、EF-1 α (elongation factor1 α)、PKC(protein Kinase C)以及线粒体基因组序列比较构建系统发育树, 解决近缘种间的关系问题, 如夏块菌(*T. aestivum* Vittad.)和勃良第块

菌(*T. uncinatum* Chatin), 黑孢块菌、冬块菌和印度块菌, 以及勃氏块菌(*T. borchii* Vittad.)、斑点块菌、白块菌和短毛块菌^[21-23]。尽管已有大量的研究工作讨论了印度块菌、中国块菌、喜马拉雅块菌、假喜马拉雅块菌(*T. pseudohimalayense* G. Moreno *et al.*)、台湾块菌间及与黑孢块菌的系统关系, 但其分类鉴定仍然是一个很棘手的问题。Paolocci 等(1997)利用 RFLP-ITS 分析了欧洲市场上的中国的黑块菌(子囊果褐色或黑色, 具有疣突; 子囊孢子表面具刺或刺-网纹饰)和黑孢块菌的关系, 结果表明中国的黑块菌与欧洲的黑孢块菌明显处于不同分支, 而来自中国的印度块菌复合群(*T. indicum* complex)则分成两大分支^[24], 随后的研究也得出了相同的结果, 但是对于这一相同结果的分类处理尚存在争议。Roux 等(1999)将这两个分支分别鉴定为喜马拉雅块菌和印度块菌^[25], 这一观点被 Zhang 等(2005)所接受^[26]。Mabru 等(2001)则认为来自中国的黑块菌包括喜马拉雅块菌或假喜马拉雅块菌在内可能都是印度块菌的不同表现形式^[27]。Wang 等(2006)利用 ITS、 β -tubulin 序列片段的分析结果接受 Mabru 等人的观点, 将喜马拉雅块菌、中国块菌、假喜马拉雅块菌均作为印度块菌的异名^[28]。陈娟等(2007)基于形态特征和 nrDNA-LSU、ITS 及 β -tubulin 三个序列的单独与联合分析, 发现假喜马拉雅块菌和拟凹陷块菌(*T. pseudoexcavatum* Y. Wang)是同一个种; 研究结果进一步揭示块菌属下各类群的系统关系与子囊果表面特征(颜色, 具有疣突、绒毛, 粗糙或光滑)及子囊孢子的特征(大小、形状、表面纹饰等)有很强的相关性, 因此在确定重要分类特征的变异范围和定义种的分类界限时应综合形态和分子生物学的证据^[19]。另外, 真菌 DNA 条形码(DNA Bar Coding)的发展, 有望应用于块菌属的分类鉴定^[29]。

国内外对块菌属的生物地理学研究涉猎鲜见, 可参考的资料很少。由于对该属所包含的种类不十分清楚, 加之缺乏对已知物种地理分布的调查, 更重要的是缺乏化石证据, 影响了对块菌属生物地理学研究的大量开展。值得一提的是, 有关块菌属的起源和演化最近有了新的可喜的进展。Jeandroz 等(2008)根据已发表的文献中记录的块菌属种的分布, 利用 ITS 序列重建了块菌属的系统发育树, 借用分子钟假说(Molecular clocks)评估了块菌属的现代地理分布格局, 推测块菌属可能起源于距今

271~140 万年间, 它们最近的共同的祖先位于欧洲或欧亚大陆(Eurasia), 经由欧-亚和欧亚-北美路线扩散形成现代的分布格局^[30]。

3 块菌属遗传多样性研究

不同地理分布的同种块菌, 个体间在表型特征和味觉属性上通常表现出一定的差异, 这些差异是受环境因素影响还是由基因决定仍存在争议。

利用随机扩增多态性 DNA(RAPD)和微卫星多态性作为分子标记研究黑孢块菌和意大利白块菌分布区内不同居群间的遗传变异, 发现这两个种的遗传多样性非常低, 研究人员试图以“冰期假说”来解释这种现象^[31]。像勃氏块菌、夏块菌等分布区域相对宽的种则表现出很高的遗传多样性^[32]。

块菌属子囊果生于地下, 采集困难, 大多数种类的地理分布还没有搞清楚, 因此该属大多数种类的遗传多样性研究工作尚未开展。就广布种而言, 针对整个分布区的遗传多样性的研究还存在一定的困难。另外, 分类鉴定中存在的问题也制约了某些相似种的遗传多样性的研究。

4 块菌属的人工栽培研究

19 世纪末, 法国的块菌自然年产量达到 1588 吨, 但在第一次世纪大战之后, 法国块菌的年产量已经下降到现在的不到 100 吨^[33], 自然产量的下降及国际市场对块菌需求量的增长促使欧洲一些国家率先开始探索块菌的人工栽培以增加块菌产量。20 世纪 70 年代, Chevalier 和 Grente (1978)成功地实现了欧洲著名的黑孢块菌的人工栽培, 并在法国、意大利、西班牙等原产国建立了种植园^[34]。目前全球最大的黑孢块菌种植园就是 1979 年在西班牙建立的, 面积达 600 公顷, 至今仍发挥着重要作用^[35]。除了在本土国家实现了黑孢块菌的大规模商业化栽培外, 黑孢块菌还被成功引种到摩洛哥、澳大利亚、新西兰、美国、加拿大、阿根廷、智利和以色列等国。人工栽培块菌的基本步骤是: 控制条件下在温棚产生菌根苗; 菌根苗移栽到种植园; 定期检测移栽的菌根苗以排除其它外生菌根真菌的竞争性感染; 块菌种植园的有效管理; 5~10 年后收获块菌子囊果。继黑孢块菌栽培成功之后, 夏块菌也成功地实现了人工栽培。2000 年, 第一个商业化栽培的夏块菌种植园在瑞典建立^[36]。目前, 人工栽培块菌已经成为南欧大部分国

家发展乡村经济的有效途径。随着块菌的规模化栽培,块菌种植园的建立及生态管理成为目前块菌应用研究的主流方向^[37]。

但是,在控制条件下成功栽培意大利白块菌尚未见报道。由于其分布区狭窄且已濒临灭绝,因而与该种相关的诸多研究,如遗传多样性、生活史、菌根、生态学及栽培等正在如火如荼地进行,并已是欧洲菌物学家目前研究的焦点^[38]。

在我国尤其是西南地区,块菌已经成为近年来大宗出口创汇的野生食用菌种类,但目前尚处于出售原始产品的状态。由于价格不断攀升,商业化地毯式的采集导致自然产量急剧下降,尽管中科院昆明植物研究所高等真菌系统与资源研究组成功地合成了印度块菌和华山松(*Pinus armandii* Franch.)、板栗(*Castanea mollissima* Bl.)的菌根幼苗,但推广与产菌任重而道远。因此,加强我国块菌属资源多样性、生态、保护生物学的调查与研究,开展块菌菌根苗木的合成及人工栽培和种植园的建立是今后工作的重心。块菌人工栽培不仅具有重大经济效益,同时对缓解自然资源的压力,保护野生物种的多样性,维护森林生态平衡也有着重要意义。

人工栽培块菌过程中,菌根苗的产生主要是采用块菌子囊孢子悬液接种合适的宿主植物。虽然研究人员尝试分离培养块菌菌丝,但由于菌丝生长缓慢难以达到接种量。块菌纯培养物的成功获得无疑会拓展块菌资源的应用,因此,通过筛选和优化培养基配方和培养条件获得纯培养物也是今后研究的一个重要内容。

5 块菌属的生活史

意大利白块菌的人工栽培尚未成功,促使研究人员探索块菌的生活史,以期通过了解块菌属产子囊果的机理,为实现白块菌的栽培提供理论依据。块菌属是比较特殊的生态类群,其生活史复杂,虽一直受国外学者的关注,但至今仍是一个谜。块菌属的发育过程可以简单分成:子囊孢子萌发产生菌丝、菌丝与宿主植物根系形成外生菌根、形成地下生的子囊果3个阶段。子囊果的形成是块菌属生活史中很特殊的一个阶段,关于这一复杂的形态发生过程的控制机制尚不清楚。核型、微卫星标记及rDNA ITS序列分析结果均表明黑孢块菌可能是同

宗配合、假同宗配合甚至是自交繁育^[39]。但是,Rubini等(2005)通过简单重复序列标记(SSR)研究意大利白块菌的遗传变异时发现,该种有基因重组现象,是一个异宗配合的种^[40]。但异宗配合是发生在块菌属所有种的生活史中,还是仅在个别种中存在至今尚不清楚。

了解块菌属的生活史对人工栽培及野生种质资源保护具有重要的生物和生态学意义。由于共生真菌的交配实验目前无法在控制条件下完成,共生真菌的交配型基因尚未分离到,在一定程度上制约了该领域的深入研究。块菌属群体遗传学工作的开展及黑孢块菌基因组测序工作的启动将为这一领域的研究提供有利信息。

6 块菌属的生物化学

块菌属子囊果独特的香味,促使人们开展块菌属化学成分的研究。早期针对黑孢块菌等几种常见的块菌属种类的挥发性芳香化合物的组成作了很多工作,研究表明二甲基硫化物(Bis-methyl thiomethane)是块菌特殊香味的主要组分^[41]。此外,研究人员在黑孢块菌中分离到一种类似于信息素的 α -雄烷醇的甾体化合物(5α -androst-16-en-3 α -ol)^[42]。在未阉公猪的唾液和男性腋汗中以及女性尿液中都发现这种化合物的存在,据记载具有催欲的作用^[43]。这一化合物的发现也为解释猪、狗能有效找到地下子囊果提供依据。

块菌属成员含有丰富的氨基酸和蛋白质,对比其它几种常见的食用菌,胱氨酸的含量在块菌属某些种类中的含量较高;其主要的脂肪酸是油酸、亚麻酸和棕榈酸^[44]。此外,麦角固醇和菜子甾醇等固醇类物质在块菌属中的含量也相当丰富,其含量还可以作为块菌属分类鉴定的生化指标^[45]。

近年来,许多结构新颖的化合物相继从本属不同种类中提取出^[46],但是关于这些新化合物的生物功能尚待深入研究。新近分离得到4个新的鞘脂类化合物则颇具药用价值,鞘脂类化合物参与调解细胞多种生物学过程,如生物信息传递和抗原抗体反应等,同时具有抗肿瘤、免疫调节和保肝等功能。

7 讨论

基于对块菌属国内外的研究历史和现状的分析,

笔者发现尚存在一系列问题还需深入研究下去,主要集中在以下几个方面:

块菌属的分类研究是基础,针对分类和系统学中存在的问题,应对每个种在观察模式标本的基础上,尽可能的补充同种其它标本的特征。仅凭模式标本往往不能反映出一个种的变异,要确定物种的变异范围,必须对大量标本进行细致观察和对比研究,同时要考虑除标本本身之外的地理分布、生境等环境因素。对属下种间系统关系的研究应尽可能收集不同国家,不同地理分布,不同生境的标本,选取多个基因片段做联合分析。此外,我国块菌资源丰富,应该加强野外调查研究,以掌握资源的分布、生态环境等,适时的通过科普宣传提高人们的保护和合理利用资源的意识。

通过对块菌属遗传多样性的研究,了解某些种类的遗传特征,对分布区域狭窄,遗传多样性水平低及地区特有种应建立合理的保护措施,避免商业化反复地毯式的采集造成物种濒危和灭绝。

本属某些种类的人工栽培已成规模化,并成为发展乡村经济的有效途径,但是菌根化苗木的合成,目前基本上都采用野生的块菌资源,然而野生的生物量不能满足生产的需要,应该尝试通过培养基质的筛选和培养条件的优化进行块菌属经济种类的纯菌种分离工作,以达到资源可持续利用的目的。此外,通过改善块菌人工种植园的生态条件,进行有效的现代化管理,来提高块菌的产量,满足国际市场的需求。

在我国印度块菌及其共生树种的菌根合成已有良好开端,这是山区造林、发展林下特殊商品形成新型产业的重要方向之一。但由于菌根化苗木移栽定植后产出块菌子实体需要时间较长,目前推广种植有一定难度,在这种情况下政府推动与资助示范会起到事半功倍的作用。

参 考 文 献

- [1] Pegler DN, Spooner BM, Yong TWK. British Truffles: A Revision of British Hypogeous Fungi. UK: Royal Botanic Gardens, Kew, 1993.
- [2] Kirk PM, Cannon PF, David JC, et al. Dictionary of the Fungi. 9th Edition. UK: CAB International, 2001.
- [3] Trappe JM. The orders, families, and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives). *Mycotaxon*, 1979, **9**: 297–340.
- [4] Vittadini C. Monographia Tuberacearum. Felicis Rusconi, Milan, 1831, pp.1–88.
- [5] Tulasne LR, Tulasne C. Fungi hypogaei: Histoire et Monographic des Champignons Hypoges. Klincksieck, Paris, 1851, pp.1–221.
- [6] Fischer E. Tuberineae. In Engler A, Harms H. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, 1938, **8**: 1–42.
- [7] Malençon G. Les Truffes Européennes. *Revue Mycologique*, 1938, **3**: 1–92.
- [8] Harkness HW. California hypogaeous fungi. *Proc Calif Acad Sci III*, 1899, **1**: 241–292.
- [9] Gilkey HM. Tuberales of America. *Oregon State College Studies in Botany*, 1939, **1**: 1–63.
- [10] Cooke MC, Massee G. Himalayan truffles. *Grevillea*, 1892, **20**: 67.
- [11] Tao K, Liu B, Zhang DC. A new species of the genus *Tuber* from China. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 1989, **12**: 215–218.
- [12] Gross G. Clé des espèces européennes du genre *Tuber*. *Documents Mycologiques*, 1991, **21**: 1–10.
- [13] Rioussset L, Rioussset G, Chevalier G, et al. Truffles d'Europe et de Chine. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 2001, pp.1–181.
- [14] Ceruti A, Fontana A, Nosenzo C. Le Specie Europee del Genere *Tuber*—Una Revisione Storica. Museo Reionale di Scienze Naturali, Torino. 2003, pp.1–467.
- [15] Trappe JM. NATS Truffle and turffle like fungi 5: *Tuber lyonii* (= *T. texense*), with a key to the spiny-spored *Tuber* species groups. *Mycotaxon*, 1996, **60**: 365–372.
- [16] Trappe JM, Cazares E. *Tuber guzmanii*, a new truffle from southern Méxco. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2006, **8**: 279–282.
- [17] Chen Juan, Pei-Gui Liu, Yun Wang. *Tuber latisporeum* sp. nov. and related taxa, based on morphology and DNA sequence dat. *Mycologia*, 2007, **99**(3): 475–481.
- [18] Chen Juan, Yun Wang, Pei-Gui Liu. Two new records of *Tuber* (Pezizomycetes, Pezizales) from China. *Mycotaxon*, 2008, **104**: 65–71.
- [19] 陈娟. 中国块菌属的分类与系统学. 中国科学院昆明植物研究所博士论文, 2007.
- [20] Lanfranco L, Wyss P, Marzachi C, et al. DNA probes for identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber magnatum* Pico. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, **114**: 245–252.
- [21] Roux C, Séjalon-Delmas N, Martins M, et al. Phylogenetic relationships between European and Chinese truffles based on parsimony and distance analysis of ITS sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **180**: 147–155.
- [22] Mabru D, Douet JP, Mouton A, et al. PCR-RFLP using a SNP on the mitochondrial Lsu-rDNA as an easy method to differentiate *Tuber melanosporum* (Perigord truffle) and

- other truffle species in cans. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, **94**: 33–42.
- [23] Halász K, Bratek Z, Szegő D, *et al.* Tests of species concepts of the small, white, European group of *Tuber* spp. based on morphology and rDNA ITS sequences with special reference to *Tuber rapaeodorum*. *Mycological Progress*, 2005, **4**: 281–290.
- [24] Paolocci F, Rubini A, Granetti B, *et al.* Typing *Tuber melanosporum* and Chinese black truffle species by molecular markers. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, **153**: 255–260.
- [25] Roux C, Séjalon-Delmas N, Martins M, *et al.* Phylogenetic relationships between European and Chinese truffles based on parsimony and distance analysis of ITS sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **180**: 147–155.
- [26] Zhang LF, Yang ZL, Song DS. A phylogenetic study of commercial Chinese truffles and their allies: taxonomic implications. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **245**: 85–92.
- [27] Mabru D, Dupré C, Douet JM, *et al.* Rapid molecular typing method for the reliable detection of Asiatic black truffle (*Tuber indicum*) in commercialized products: fruiting bodies and mycorrhizal seedlings. *Mycorrhiza*, 2001, **11**: 89–94.
- [28] Wang YJ, Tan ZM, Zhang DC, *et al.* Phylogenetic and populational study of the *Tuber indicum* complex. *Mycological Research*, 2006, **110**: 1034–1045.
- [29] Karkouri KE, Murat C, Zampieri E, *et al.* Identification of internal transcribed spacer sequence motifs in truffles: a first step toward their DNA bar coding. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(16): 5320–5330.
- [30] Jeandroz S, Murat C, Wang YJ, *et al.* Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the ‘true truffles’. *Journal of Biogeography*, 2008, **35**: 815–829.
- [31] Mello A, Murat C, Vizzini A, *et al.* *Tuber magnatum* Pico, a species of limited geographical distribution: its genetic diversity inside and outside a truffle ground. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**: 55–65.
- [32] Sica M, Gaudio L, Serena. Genetic structure of *Tuber mesentericum* Vitt. based on polymorphisms at the ribosomal DNA ITS. *Mycorrhiza*, 2007, **17**: 405–414.
- [33] Callot G, Bye P, Raymond M, *et al.* La truffe, la terre, La vie. INRA, Paris, 1999, p.210.
- [34] Chevalier G, Grente J. Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne: production à grande échelle de plants mycorrhisés par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). *Mushroom Sci*, 1978, **10**: 483–505.
- [35] Oliach D, Bonet JA, Fischer CR, *et al.* Guia Técnica para el Cultivo de la Trufa Negra (*Tuber melanosporum* Vitt.). Centre Tecnològic Forestal de Catalunya, Solsona, Spain, 2005, p.16.
- [36] Wedén C, Ericsson L, Danell E. Tryffelnheter från Gotland. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 2001, **95**: 205–211.
- [37] Bonet JA, Fischer CR, Colinas C. Cultivation of black truffle to promote reforestation and land-use stability. *Agron Sustain Dev*, 2006, **26**: 69–76.
- [38] Murat C, Vizzini A, Bonfante P, *et al.* Morphological and molecular typing of the below-ground fungal community in a natural *Tuber magnatum* truffle-ground. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **245**: 307–313.
- [39] Murat C, Di’ez J, Luis P, *et al.* Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, 2004, **164**: 401–411.
- [40] Rubini A, Paolocci F, Riccioni C, *et al.* Genetic and phylogeographic structure in the symbiotic fungus *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**: 6584–6589.
- [41] Pacioni G, Bellina-Agostinone C, D’Antonio M. Odour composition of the *Tuber melanosporum* complex. *Mycological Research*, 1990, **94**: 201–204.
- [42] Claus R, Hoppen HO, Karg H. The secret of truffles: A steroidal pheromone? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1981, **37**: 1178–1179.
- [43] 刘吉开, 真菌化学. 北京: 中国科学技术出版社, 2004, pp.1–285.
- [44] Beuchat LR, Brennenman TB, Dove CR. Composition of the pecan truffle (*T. texense*). *Food Chemistry*, 1993, **46**: 189–192.
- [45] Harki E, Klaebe A, Talou T, *et al.* Identification and Quantification of *Tuber melanosporum* Vittad. sterols. *Steroids*, 1996, **61**: 609–612.
- [46] Gao JM, Zhang AL, Wang CY, *et al.* A new ceramide from the ascomycete *Tuber indicum*. *Chinese Chemical Letters*, 2002, **4**: 31–33.