

单孢分离菌株的异核不对称特性揭示梯棱羊肚菌为假同宗结合真菌

柴红梅, 马渊浩, 刘萍, 陈卫民, 陶南, 赵永昌*

云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650205

摘要: 本文以基因组数据显示只具有 *MAT1-1* idiomorph 的单孢菌株 YPL6-3 和只具有 *MAT1-2* idiomorph 的单孢菌株 YPL6-1 为材料, 研究它们子代的子囊果、单孢菌株群体和同一子囊中 8 个单孢菌株的交配型分布情况。YPL6-3 和 YPL6-1 菌株分别隔离栽培和互补混栽均能形成正常的子囊果, 其子囊果菌柄交配型分布与亲本菌株有关。PCR 扩增检测 235 株子代单孢菌株的交配基因出现有趣现象: 一些菌株的 *MAT1-1-1* 基因电泳条带强, 而 *MAT1-2-1* 基因的条带弱; 另一些菌株则 *MAT1-1-1* 基因条带弱, 而 *MAT1-2-1* 基因条带强。同时也有两基因条带都强或者一基因条带强, 另一基因无条带的菌株。从 3 个子囊果中共挑取了 10 个子囊, 并对每个子囊中的单孢进行独立分离, PCR 扩增并电泳检测交配基因时也出现了上述相同的情况。若 *MAT1-1-1* 强, 则 *MAT1-2-1* 弱或无, 这样的菌株在同一子囊中不会超出 4 个, 反之亦然。利用长片段 PCR 扩增 YPL6-1 和 YPL6-3 菌株的全长 *MAT* idiomorph, 利用 Nanopore 测序技术对扩增子进行单分子实时测序, 2 次重复实验的序列比对发现: 菌株 YPL6-1 中存在 99.63% 和 99.81% 的 *MAT1-2* idiomorph 分子及 0.37% 和 0.19% 的 *MAT1-1* idiomorph 分子; 菌株 YPL6-3 中存在 99.45% 和 99.74% 的 *MAT1-1* idiomorph 分子及 0.55% 和 0.26% 的 *MAT1-2* idiomorph 分子。从而证实, 这 2 个基因组测序和 PCR 扩增都只能检测到一种交配型的菌株, 其实是异核菌株, 只是 2 种交配型核的数量占比存在较大偏离。根据上述现象推断, 梯棱羊肚菌的子囊孢子都是异核的, 萌发后形成的单孢菌株具有异核不对称特点, 从而推测梯棱羊肚菌是一种特殊的假同宗子囊菌, 同时也揭示了梯棱羊肚菌单孢出菇的真相。

关键词: 羊肚菌; *MAT* idiomorph; 交配基因; Nanopore 测序; 异宗结合

[引用本文] 柴红梅, 马渊浩, 刘萍, 陈卫民, 陶南, 赵永昌, 2022. 单孢分离菌株的异核不对称特性揭示梯棱羊肚菌为假同宗结合真菌. 菌物学报, 41(10): 1607-1618

Chai HM, Ma YH, Liu P, Chen WM, Tao N, Zhao YC, 2022. The asymmetrical distribution of opposite mating type nuclei in single-ascospore isolates revealed *Morchella importuna* is a pseudohomothallic fungus. Mycosystema, 41(10): 1607-1618

基金项目: 国家自然科学基金(31460014, 31960621); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS20) Supported by the National Natural Science Foundation Program of China (31460014, 31960621) and the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS20).

*Corresponding author. E-mail: yaasmushroom@aliyun.com

Received: 2022-01-22, accepted: 2022-03-15

The asymmetrical distribution of opposite mating type nuclei in single-ascospore isolates revealed *Morchella importuna* is a pseudohomothallic fungus

CHAI Hongmei, MA Yuanhao, LIU Ping, CHEN Weimin, TAO Nan, ZHAO Yongchang*

Biotechnology and Genetic Germplasm Resource Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan, China

Abstract: The mating-types of F1 ascocarps, single-ascospore populations and eight single-ascospore strains in an ascus were analyzed based on the crossing of single-ascospore strains YPL6-1 and YPL6-3 of *Morchella importuna* which harbored *MAT1-2* and *MAT1-1* idiomorph respectively in their genome-sequencing data. Under the conditions of sowing separately and mix-sowing, strains YPL6-1 and YPL6-3 could fructify normally, and the distribution of mating type in the stipe was related to the parent strain. When the mating type tests were carried out by PCR amplification in 235 single-ascospore strains, something interesting happened: the electrophoretic bands of *MAT1-1-1* gene in some strains were bright, but the bands of *MAT1-2-1* were weak. In other strains, the *MAT1-1-1* band was weak, while the *MAT1-2-1* band was bright. Meanwhile, there were strains that two mating gene bands were bright, or strains that one mating gene band was bright while the opposite mating gene band unappeared. Ten asci were separated from three ascocarps and corresponding single ascospores were isolated from each ascus, and the mating types of these single-ascospore strains were analyzed. As a result, the same phenomenon occurred. The single-ascospore strains showing bright *MAT1-1-1* band and weak or no *MAT1-2-1* band originated from no more than four spores in an ascus, and vice versa. The PCR amplicons of *MAT* loci in the YPL6-1 and YPL6-3 were sequenced respectively by nanopore approach, and corresponding experiments were repeated twice. The alignment analysis indicated that there were 99.63% and 99.81% *MAT1-2* idiomorphs, and 0.37% and 0.19% *MAT1-1* idiomorphs in the strain YPL6-1, meanwhile, the strain YPL6-3 contained 99.45% and 99.74% *MAT1-1* idiomorphs, and 0.55% and 0.26% *MAT1-2* idiomorphs. The result confirmed that these two single-ascospore strains were actually heterokaryotic, however, there was a great deviation in proportion of two mating type nuclei. It is speculated that all ascospores in *M. importuna* are heterokaryotic, and the opposite mating type nuclei are asymmetrically distributed in mycelia germinated from single ascospore. Therefore, *M. importuna* is a pseudohomothallism ascomycete fungus, and the single-ascospore strain could be self-fertile.

Keywords: morel; *MAT* idiomorph; mating gene; Nanopore sequencing; heterothallism

梯棱羊肚菌 *Morchella importuna* M. Kuo *et al.* 隶属于子囊菌门 Ascomycota, 盘菌纲 Pezizomycetes, 羊肚菌科 Morchellaceae, 羊肚菌属 *Morchella* Dill. ex Pers., 属内所有种类皆美味、可食, 且具有高营养价值和提高机体免疫的

功效(Tietel & Masaphy 2018; Wang *et al.* 2020), 是著名珍稀食用菌。目前, 羊肚菌属内部分种已实现人工栽培(Ower 1982; Liu *et al.* 2018a), 梯棱羊肚菌和六妹羊肚菌 *M. sextelata* 为我国商业主栽物种, 栽培产业发展迅猛。在羊肚菌产业快

速发展的同时,对其基础生物学方面的研究也方兴未艾(Han *et al.* 2019; Tan *et al.* 2021; Yuan *et al.* 2021),但相较于担子菌如异担子菌 *Heterobasidion annosum* (Dai *et al.* 2003)、蜜环菌 *Armillaria* spp. (秦国夫等 2000)、香菇 *Lentinula edodes* 和黑木耳 *Auricularia heimuer* 等,羊肚菌的研究仍然有许多空白和薄弱环节,如羊肚菌的生活史研究就有多个版本(Volk & Leonard 1990; Pilz *et al.* 2007; Alvarado-Castillo *et al.* 2014; Du & Yang 2021),且目前仍未有定论。

子囊菌的有性生殖由单一交配位点 *MAT1* 调控,位点上有 *MAT1-1* 或 *MAT1-2* 两种交配型,它们之间存在极低的同源性,因此用同源异构体 *idiomorph* 来命名(Turgeon & Yoder 2000)。异宗结合(heterothallism)子囊菌的单倍体核上只存在 *MAT1-1* 或 *MAT1-2 idiomorph* 的一种,有性生殖需要具有互补交配型的单孢菌株结合(Coppine *et al.* 1997)。同宗结合(homothallism)子囊菌的单倍体基因组中,*MAT1-1* 和 *MAT1-2* 连锁或者分散性地存在,一个单孢菌株即能完成有性生殖。若物种的单子囊孢子中同时存在具有互补交配型的核,一个单孢菌株可完成有性生殖,则为二级同宗(secondary homothallism)或者假同宗结合(pseudohomothallism) (Nelson 1996; Debuchy & Turgeon 2006)。Chai *et al.* (2017)、Liu *et al.* (2018b)以及 GenBank 公开的多个梯棱羊肚菌单孢菌株全基因组测序数据(<http://genome.jgi.doe.gov/Morcol/Morcol.home.html>; <http://genome.jgi.doe.gov/Morimp1/Morimp1.home.html>)表明,这些单孢菌株基因组中都只能找到一种交配型的 *idiomorph*,且它们具有相同的侧翼序列,存在于染色体的同一位点上,证实梯棱羊肚菌是异宗结合真菌,即需要具有互补交配型单孢菌株结合才能进行有性繁育。但研究中同时也发现了一些令人不解的现象:梯棱羊肚菌单孢菌株能正常出菇(贺新生等 2019; 刘伟等 2019; 谭方河

2019);存在异核体子囊孢子(贺国强 2021; 刘萍等 2021);栽培和野生子囊果中都发现菌柄只有一种交配型而子实层有 2 种交配型的现象(Du *et al.* 2017);2 种交配型在子囊果不同部位发生偏分离(刘伟等 2020; He *et al.* 2021);有的菌核中只能检测到一种交配型(蒋林林等 2021)等等。这些现象在异宗结合真菌中难以解释,那么是否还存在其他我们所不知道的繁育模式?还是在单子囊孢子中 2 种交配型的核都存在,而 PCR 检测其萌发后的菌株时只能检测到其中一种?

Nanopore 技术能实现单分子、长片段的实时测序。单分子 DNA 以一定速率通过纳米孔,引起不同电信号的变化,通过对这些电信号变化进行检测和解析,完成序列的实时测定(Deamer *et al.* 2016; Jain *et al.* 2016; Magi *et al.* 2018)。本研究以基因组数据分别只存在 *MAT1-1* 或 *MAT1-2 idiomorph* 的 2 株单孢菌株为材料, Nanopore 测序分析其全长 *idiomorph* 的 PCR 扩增产物中,是否还隐藏着另一种 *MAT idiomorph* 信息;同时采用毛细管分离技术分离单孢群体和一个子囊中的 8 个单孢,分析它们的交配型组成,以期明确 2 种交配型在单孢菌株中的真实存在情况。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和子囊果

梯棱羊肚菌单孢菌株 YPL6-1 和 YPL6-3 分离自云南省禄丰市人工栽培的子囊果 YPL6,利用 PCR 检测交配型,琼脂糖凝胶电泳结果显示,YPL6-1 菌株只能扩增出 *MAT1-2-1* 基因,YPL6-3 菌株只能扩增出 *MAT1-1-1* 基因。它们的基因组数据储存在中国科学院北京基因组研究所(国家生物信息中心 BGI),登记号分别为 GWHBCHM000000000 和 GWHBCHL000000000。基因组数据分析表明,菌株 YPL6-1 的基因组中

只存在 *MAT1-2* idiomorph 而没有 *MAT1-1* idiomorph, 同样, 菌株 YPL6-3 的基因组中只有 *MAT1-1* idiomorph 而没有 *MAT1-2* idiomorph, 因此认为菌株 YPL6-1 为 *MAT1-2* 交配型, 菌株 YPL6-3 为 *MAT1-1* 交配型。

子囊果 Y1-1、Y1-2 和 Y1-3 来自菌株 YPL6-1 栽培, 子囊果 Y3-1、Y3-2 和 Y3-3 来自菌株 YPL6-3 栽培, 子囊果 Y1Y3-1、Y1Y3-2 和 Y1Y3-3 来自菌株 YPL6-1 和 YPL6-3 混合栽培, 栽培地均在云南省昆明市晋宁区。

梯棱羊肚菌子囊果 YAASM5 和 YAASM7 均于 2020 年采自云南省武定县人工栽培大田, 标本保存于云南省农业科学院种质资源库食用菌中心。

1.2 羊肚菌栽培

参考刘伟等(2017b)的方法, 分别进行菌株 YPL6-1、YPL6-3 独立和混合栽培处理。为减少菌丝互串影响试验的准确性, 栽培在筐内进行, 每个栽培处理 10 筐, 2018 年 11 月搭建 3 个独立的菇棚, 棚间距不小于 50 m, 棚四周及顶用大棚塑料薄膜围绕, 薄膜外 50 cm 用双层 6 针加密遮阳网搭建遮阴, 保证隔离的条件下尽量做到遮阴降温, 进行完全相同的管理。2020 年 11 月进行重复栽培试验, 菌株 YPL6-1、YPL6-3 及其混合栽培分别放在 3 个六妹羊肚菌栽培大棚中进行, 每个栽培处理 9 m², 大棚间距不小于 100 m, 保证菌丝不能互相串联, 棚四周用塑料薄膜遮挡也尽量避免分生孢子随风串联。

1.3 单孢分离

子囊果 YAASM5、YAASM7 和 Y1Y3-1 用于分离单子囊中的单孢。用无菌镊子夹取小块有成熟子囊的菌肉, 放置于无菌载玻片上的适量水滴中, 轻轻压碎至释放出独立的子囊。在显微镜 10×视野下观察, 找到有 8 个成熟孢子的子囊, 用自制的直径约 20 μm 的毛细管将单个子囊吸出(图 1A), 放入 200 μL 透明 PCR 管(含 30 μL

无菌水)中, 在 10×显微镜下再次确认管中有无子囊。将有子囊的管放在超声波破碎仪中超声 1 min, 之后用 10 μL 移液枪将管中所有液体吸放在无菌载玻片上, 观察液体中是否有独立的孢子。用毛细管把孢子逐一吸出(图 1B)分别放在直径 6 cm 的 YPD 平板上, 22 °C 下暗培养 12 h 后观察萌发。

子囊果 Y1Y3-2 和 Y1Y3-3 用于分离单子囊孢子, 参考刘萍等(2021)的方法, 在 10×显微镜下用毛细管吸出单个子囊孢子放在 YPD 平板上, 一个直径 6 cm 的平板放一个孢子, 保证萌发的菌丝都来源于一个单孢。

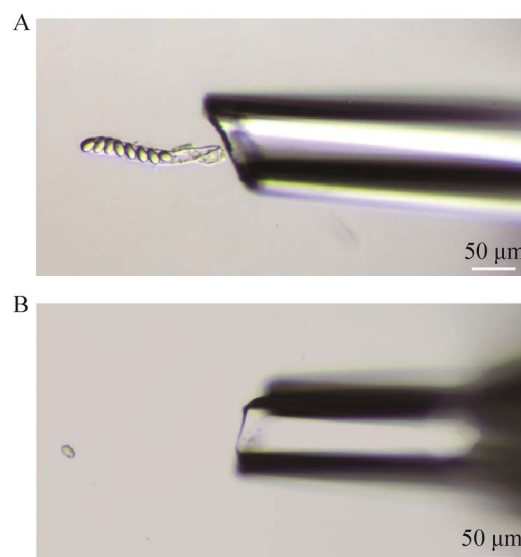


图 1 毛细管吸取单个子囊(A)和单个子囊孢子(B)
Fig. 1 Sucking one ascus (A) and one ascospore (B) by capillary.

1.4 交配基因检测

采用试剂盒 EZgene™ Fungal gDNA Kit (BIOMIGA Inc.)提取基因组 DNA, 引物对 P8f (5'-ATGTCACTCCGTCCGGTTTACCTTA-3') 和 P8r (5'-TGGAATGTCTGTGATTGAGGCTGTG-3') 扩增 *MAT1-1-1* 基因, 引物对 P10f (5'-GGCC AGAACAGATGCTCGAAGAAGC-3') 和 P10r (5'-CTCCCAAAGCATGATCAAATCCCTC-3') 扩增

MAT1-2-1 基因, PCR 反应体系和扩增条件参考 Chai *et al.* (2017)的方法。

1.5 交配位点全长扩增和 Nanopore 测序分析

菌株 YPL6-1 和 YPL6-3 的交配位点全长 idioph 扩增参照 Chai *et al.* (2019)的方法, 采用 LA *Taq* DNA 聚合酶扩增体系[宝日医生物技术(北京)有限公司]: 10×La PCR buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 8 μL, 引物 P11-2f (5'-ATGT ATGTGTGGGGGAGCGGGTAGAT-3')和 P11-2r (5'-GAGATGCGACAACAGACATTGGGCT-3') (10 pmol/L)各 1 μL, 模板 DNA (10 ng/μL) 1 μL, LA *Taq* 0.5 U, 补 ddH₂O 至 50 μL。两步法 PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 10 s, 68 °C 退火加延伸 9 min, 35 个循环; 72 °C 下最终延伸 10 min。

PCR 产物胶回收后, 交由武汉贝纳科技服务有限公司进行 Nanopore 测序和分析。进行 2 次重复实验, 第一次实验每个样品产生 1 Gb 数据量, 第二次实验每个样品产生 2 Gb 数据量, 其他操作完全一致。测序的 raw reads 去除平均值 ≤7 的序列得到 clean reads, 用 minimap2 软件(参数 -ax map-ont)分别比对梯棱羊肚菌的 *MAT1-1* idioph (KY782630) 和 *MAT1-2* idioph (KY782629)序列, 基于比对结果文件(sam 文件)中的第二列(flag)统计比对到 *MAT1-1* 和 *MAT1-2* 上的 reads 数。

2 结果与分析

2.1 只检测到一种交配型的单孢菌株栽培能正常出菇

2018 年 11 月的栽培试验, 于 2019 年 3 月初菌株 YPL6-1 和 YPL6-3 的棚中各收获 3 个子囊果, 混合栽培收获了 6 个子囊果; 2020 年 11 月的栽培试验, 于 2021 年 4 月统计出菇情况, YPL6-1 菌株收获干菇 56.4 g, YPL6-3 菌株收获

干菇 45.7 g, 混播菌株收获干菇 250.1 g。2 次的单独和混种结果表明, PCR 检测结果只有一种交配型基因的菌株栽培能出菇, 但是就出菇数量而言, 混播的明显多于单独栽培的, 即交配型基因的分布对出菇是有影响的。

多项研究发现, 羊肚菌单孢菌株能出菇 (Ower 1986; 贺新生等 2019; 谭方河 2019), 刘伟等(2019)认为可能是由于无性孢子传播等自然引入了另一交配型的细胞核。为了防范外来细胞核的引入, 本研究做了相对严格的隔离, 单孢菌株 YPL6-1 和 YPL6-3 在 2 年的栽种试验中, 都收获了正常子囊果。2018 年的栽培试验, 由于塑料薄膜隔离、盆栽、温度和湿度等条件不太适合, 都只收获到 3 个子囊果, 虽然产量都不高, 但仍然证实了这 2 个单孢菌株能栽培出菇。

2.2 PCR 检测单孢菌株的交配基因出现强弱带

子囊果 Y1Y3-2 和 Y1Y3-3 共分离单孢菌株 400 株, 其中的 235 株检测了交配基因 *MAT1-1-1* 和 *MAT1-2-1*, 部分电泳检测结果见图 2A, 有的菌株只检测到一个交配基因(如 11、12、16), 有的菌株 2 个交配基因都能检测到(如 14、18、19), 还有的菌株一个交配基因扩增条带强, 另一交配基因扩增条带非常弱或者只能观察到隐约条带(如 3、4、5、6、7、8 等)。统计这 235 株菌株的 PCR 检测结果(表 1), 发现这些单孢菌株的交配基因分布存在 3 种类型, I: *MAT1-1-1* 强, *MAT1-2-1* 弱或无; II: *MAT1-2-1* 强, *MAT1-1-1* 弱或无; III: 2 个基因条带都强。从 2 个子囊果的合计结果看, 每一类型单孢菌株的数量和比例大体接近, II 类型稍高一些。

羊肚菌单子囊孢子分离物中同时检测到交配基因 *MAT1-1-1* 和 *MAT1-2-1* 已有报道(贺国强 2021; 刘萍等 2021), 证明羊肚菌中的确存在异核体单孢。但 PCR 扩增检测时一个交配基因为亮条带, 则另一交配基因就为弱条带的现象令人

费解。多次重复实验得到相同结果, 排除了实验操作过程中可能带来的误差; 相同的 DNA 模板和相同的加量, 排除了模板质量不好导致扩增条带弱的疑问; 不加模板的阴性对照完全无条带, 排除了试剂污染的可能; 弱条带回收后克隆测序, 序列比对证实确为交配基因, 排除了杂带污

染的疑问。因此推测这种现象可能是由于 2 个基因在模板 DNA 中存在的比例差异引起。

2.3 交配基因 *MAT1-1-1* 和 *MAT1-2-1* 在单孢出菇子囊果菌柄菌盖中的不均匀分布

2020 年单孢菌株 YPL6-1、YPL6-3 及混播栽培出菇的子囊果各取 3 个, 分别提取它们菌盖

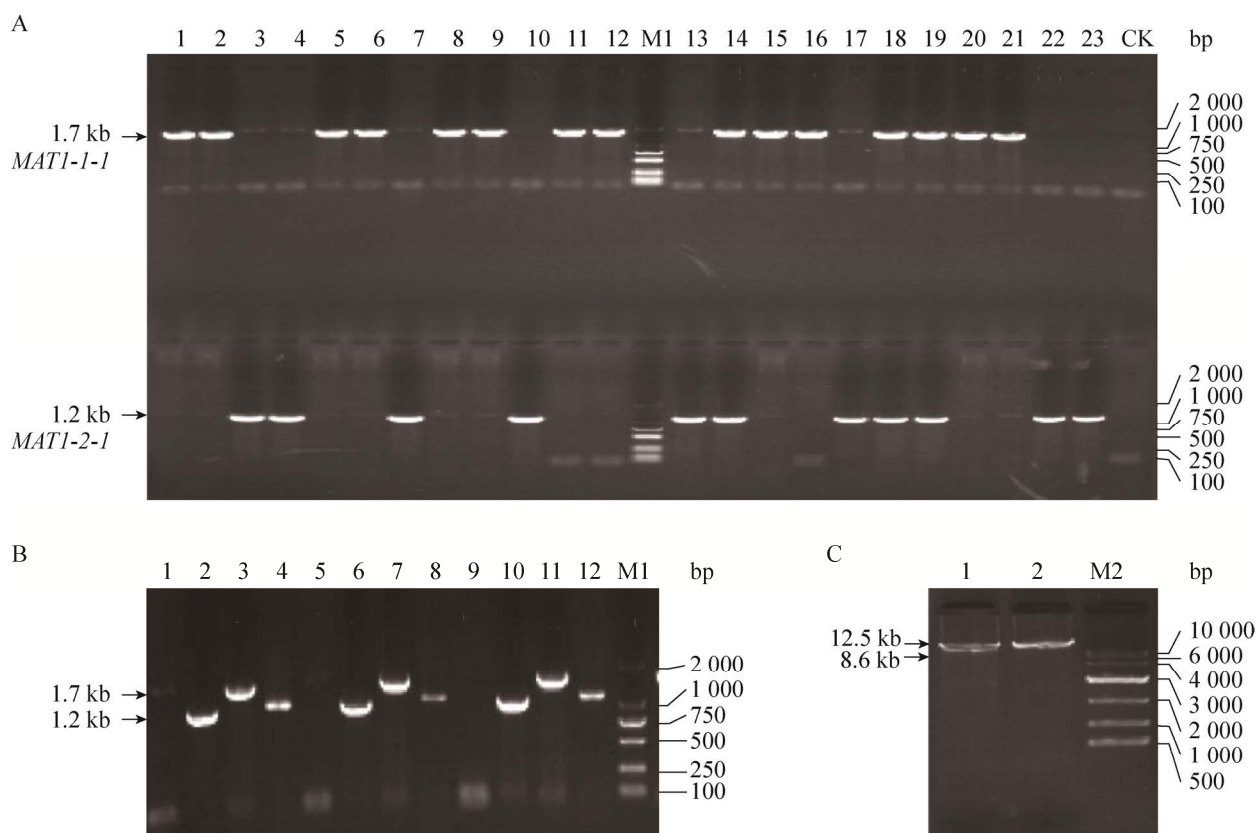


图 2 PCR 产物电泳图 A: 单孢菌株交配基因 PCR 扩增产物. 1-23: 23 个单孢菌株分别扩增 *MAT1-1-1* 和 *MAT1-2-1* 交配基因的 PCR 产物; M1: DL2000 marker; CK: 不加模板负对照. B: 子囊果 Y1-1、Y1-2、Y1-3 菌柄菌盖组织交配基因 PCR 扩增产物. 1, 5, 9: 菌柄组织的 *MAT1-1-1* 基因扩增产物; 2, 6, 10: 菌柄组织的 *MAT1-2-1* 基因扩增产物; 3, 7, 11: 菌盖组织的 *MAT1-1-1* 基因扩增产物; 4, 8, 12: 菌盖组织的 *MAT1-2-1* 基因扩增产物; M1: DL2000 marker. C: 菌株 YPL6-1、YPL6-3 的 *MAT* idiomorph PCR 扩增产物. 1: 菌株 YPL6-1 的 *MAT* idiomorph 扩增产物; 2: 菌株 YPL6-3 的 *MAT* idiomorph 扩增产物; M2: DL10000 marker

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of the PCR products. A: Mating gene PCR products in the single ascospore strains. 1-23: Mating gene PCR products in 23 single ascospore strains; M1: DL2000 marker; CK: Negative control of no template. B: Mating gene PCR products in the stipe and pileus of ascocarps Y1-1, Y1-2 and Y1-3. 1, 5, 9: PCR products of *MAT1-1-1* in the stipe; 2, 6, 10: PCR products of *MAT1-2-1* in the stipe; 3, 7, 11: PCR products of *MAT1-1-1* in the pileus; 4, 8, 12: PCR products of *MAT1-2-1* in the pileus; M1: DL2000 marker. C: *MAT* idiomorph PCR products in the YPL6-1 and YPL6-3. 1: *MAT* idiomorph in the YPL6-1; 2: *MAT* idiomorph in the YPL6-3; M2: DL10000 marker.

表 1 两子囊果单孢分离菌株交配基因的 PCR 检测结果

Table 1 The results of PCR amplification of *MAT1-1-1* and *MAT1-2-1* genes of single-ascospore strains from two ascocarps of *Morchella importuna*

子囊果 Ascocarp	单孢菌株数量 Number of single-ascospore strain	交配型类型 Category of mating type					
		I ^a		II ^b		III ^c	
		数量 Number	比例 Ratio (%)	数量 Number	比例 Ratio (%)	数量 Number	比例 Ratio (%)
Y1Y3-2	145	38	26.21	64	44.13	43	29.66
Y1Y3-3	90	32	35.56	28	31.11	30	33.33
合计 In total	235	70	29.79	92	39.15	73	31.06

注：^a *MAT1-1-1* 强，*MAT1-2-1* 弱或无；^b *MAT1-2-1* 强，*MAT1-1-1* 弱或无；^c *MAT1-1-1* 和 *MAT1-2-1* 都强
Note: ^a *MAT1-1-1* bright, *MAT1-2-1* weak or none; ^b *MAT1-2-1* bright, *MAT1-1-1* weak or none; ^c *MAT1-1-1* and *MAT1-2-1* bright.

和菌柄组织的 DNA，PCR 扩增检测交配基因 *MAT1-1-1* 和 *MAT1-2-1*。结果发现，所有 9 个子囊果的菌盖中 2 个交配基因都能检测到，表明具有 2 种交配型，而菌柄中交配基因分布不一致(表 2)。菌株 YPL6-1 (*MAT1-2*)的 3 个子囊果菌柄，*MAT1-1-1* 基因条带弱或未检测到，*MAT1-2-1* 基因都得到亮条带(图 2B)；菌株 YPL6-3 (*MAT1-1*)的 3 个子囊果菌柄，2 个的 *MAT1-2-1* 条带弱，一个条带正常，而 *MAT1-1-1* 基因都得到亮条带；混合栽培得到的 3 个子囊果，除 Y1Y3-1 的菌柄 *MAT1-1-1* 基因检测条带弱外，其余的条带都亮。检测结果表明，子代子囊果菌柄的交配型分布与亲本菌株相关，亲本菌株中 PCR 检测缺失的交配型，在其子代子囊果的菌柄中也会出现检测缺失或者条带弱的现象，而菌盖中则两种交配型都存在。

2.4 单子囊单孢分离菌株的交配型

分离过程发现单子囊分离并吸入管中容易做到，但超声振荡破壁后，8 个子囊孢子有的会

挂壁于管或吸头，或者被超声波损伤而不能萌发，因此获得全部 8 个孢子的萌发菌株有一定难度。试验中，子囊果 YAASM5 的 4 个子囊分别获得 5、5、6 和 7 个单子囊孢子菌株，YAASM7 的 3 个子囊分别获得 5、6 和 6 个单子囊孢子菌株，Y1Y3-1 的 3 个子囊分别获得了 7、8 和 8 个单子囊孢子菌株。这些单孢菌株的交配基因检测结果(表 3)表明，一个子囊中单孢菌株的交配型可以分为 2 种情况：I：一种交配型强，另一种交配型弱或无；II：2 种交配型都强。出现情况 I 的比例较大，若 *MAT1-1* 强，则 *MAT1-2* 弱或无，同一子囊中同类型的菌株不会超过 4 个，反之亦然。猜测每个子囊中可能是 4 个孢子萌发菌株的 *MAT1-1* 型核占比多，*MAT1-2* 型核占比少；另 4 个孢子萌发菌株的 *MAT1-2* 型核占比多，*MAT1-1* 型核占比少。培养过程中 2 种核的占比也会发生变化，当占比少的交配型核增殖加强时就会出现 2 个交配型都强的情况。

表 2 子囊果菌柄菌盖中交配基因检测结果

Table 2 The test results of mating gene in stipes and pilei of ascocarps of *Morchella importuna*

交配基因 Mating gene	Y1-1		Y1-2		Y1-3		Y3-1		Y3-2		Y3-3		Y1Y3-1		Y1Y3-2		Y1Y3-3	
	柄 盖		柄 盖		柄 盖		柄 盖		柄 盖		柄 盖		柄 盖		柄 盖		柄 盖	
	Stipe	Pileus	Stipe	Pileus	Stipe	Pileus	Stipe	Pileus	Stipe	Pileus	Stipe	Pileus	Stipe	Pileus	Stipe	Pileus	Stipe	Pileus
<i>MAT1-1-1</i>	±	+	±	+	-	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+
<i>MAT1-2-1</i>	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+

注：+：强扩增条带；-：没有扩增条带；±：扩增条带很弱
Note: +: Bright band; -: No band; ±: Weak band.

表 3 单子囊内菌株的交配基因检测结果
Table 3 The test results of mating gene in the strains from single ascus of *Morchella importuna*

子囊果 Ascocarp	子囊编号 No. of ascus	交配基因 Mating gene	单子囊中子囊孢子编号 No. of ascospore in one ascus							
			1	2	3	4	5	6	7	8
YAASM5	1	<i>MAT1-1-1</i>	+	-	+	±	+			
		<i>MAT1-2-1</i>	-	+	±	+	±			
	2	<i>MAT1-1-1</i>	-	+	±	+	+			
		<i>MAT1-2-1</i>	+	-	+	+	±			
	3	<i>MAT1-1-1</i>	+	-	±	-	+	+		
		<i>MAT1-2-1</i>	+	+	+	+	±	±		
	4	<i>MAT1-1-1</i>	±	+	+	+	+	-	-	
		<i>MAT1-2-1</i>	+	±	-	-	±	+	+	
YAASM7	5	<i>MAT1-1-1</i>	+	±	+	+	-			
		<i>MAT1-2-1</i>	±	+	+	+	+			
	6	<i>MAT1-1-1</i>	+	+	-	±	-	-		
		<i>MAT1-2-1</i>	±	±	+	+	+	+		
	7	<i>MAT1-1-1</i>	+	-	+	±	±	+		
		<i>MAT1-2-1</i>	±	+	+	+	+	+		
Y1Y3-1	8	<i>MAT1-1-1</i>	+	+	±	+	±	+	±	
		<i>MAT1-2-1</i>	±	+	+	+	+	+	+	
	9	<i>MAT1-1-1</i>	+	+	-	±	-	+	±	+
		<i>MAT1-2-1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	<i>MAT1-1-1</i>	±	+	±	+	+	+	±	+
		<i>MAT1-2-1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

注：+：强扩增条带；-：没有扩增条带；±：扩增条带很弱
Note: +: Bright band; -: No band; ±: Weak band.

2.5 单孢菌株中 *MAT1-1* 和 *MAT1-2* idiomorph 以极不对等占比存在

引物对 P11-2f/2r 基于交配位点两端的保守序列设计，可扩增黑色和黄色类群羊肚菌的

MAT1-1 和 *MAT1-2* idiomorph 全长序列(Chai *et al.* 2019)，扩增片段带部分相同侧翼序列(图 3)。菌株 YPL6-1 和 YPL6-3 扩增出的片段大小分别为 8.6 kb 和 12.5 kb,但从琼脂糖凝胶电泳检测结果

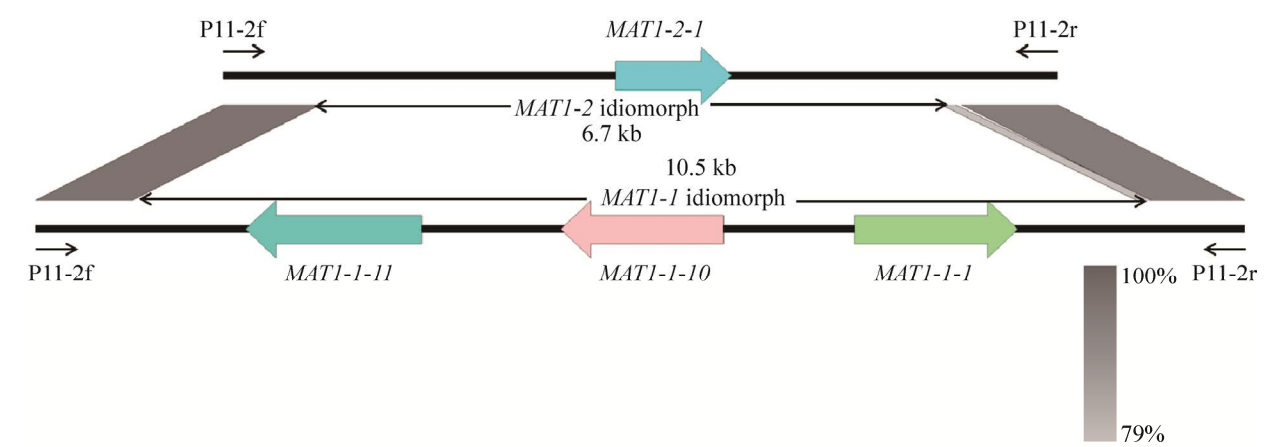


图 3 梯棱羊肚菌交配位点结构图
Fig. 3 Organization of the *MAT* locus in *Morchella importuna*.

看,两个片段大小差别并不明显(图 2C)。PCR 产物建库后在 Oxford Nanopore PromethION 测序仪进行实时单分子测序。从测序的读头长度和数据量分布图中看出,大部分的读头都获得了整个扩增子的全长序列,也有部分读头长度小于扩增子长度(图 4),可能是测序过程中马达蛋白牵引的 DNA 分子发生断裂所致。

测序后的 clean reads 分别比对到梯棱羊肚菌 10.5 kb 长的 *MAT1-1* idiomorph 和 6.7 kb 长的 *MAT1-2* idiomorph 序列,这 2 个序列间没有任何同源性(图 3),因此短读头比对也不会出现误判。去除无效数据后,2 次样品送测的统计结果见表 4。YPL6-1 菌株的交配位点扩增子中,除 99.63%和 99.81%的 *MAT1-2* idiomorph 分子外,

还存在极低数量(0.37%和 0.19%)的 *MAT1-1* idiomorph 分子;同样,YPL6-3 菌株的交配位点扩增子中,除 99.45%和 99.74%的 *MAT1-1* idiomorph 分子外,还存在极低数量(0.55%和 0.26%)的 *MAT1-2* idiomorph 分子。虽然经过 PCR 反应,目标序列得到了指数级扩增,但通过 Nanopore 单分子测序,YPL6-1 中检测到的 *MAT1-1* idiomorph 分子只有 1 044 条和 812 条,YPL6-3 中检测到的 *MAT1-2* idiomorph 分子只有 634 条和 941 条,推算它们在 DNA 模板中的存在比例更低,这大概就是 PCR 扩增出现强弱势的原因,同时这也是基因组测序也检测不到的原因。因此,我们推测那些只能检测到一种交配型的单孢菌株应该也是同样的情况,另一交配型

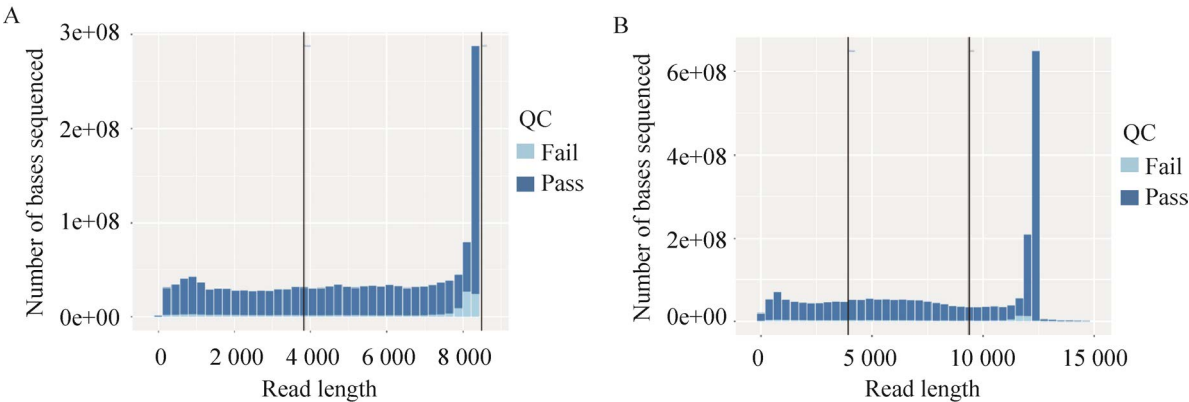


图 4 第二次重复实验测序数据的 reads 长度和数据量分布图 A: YPL6-1 菌株测序数据的 reads 长度和数据量分布图. B: YPL6-3 菌株测序数据的 reads 长度和数据量分布图

Fig. 4 The histogram showing the number of sequenced bases against sequence length in the second experiment. A: The number of sequenced bases against sequence length of YPL6-1. B: The number of sequenced bases against sequence length of YPL6-3.

表 4 Nanopore 测序数据比对结果统计表

Table 4 The alignment results of nanopore-sequencing reads						
菌株 Strain	重复 Repeat	总有效读头数 Total valid reads	<i>MAT1-1</i> idiomorph 读头数 Reads of <i>MAT1-1</i> idiomorph		<i>MAT1-2</i> idiomorph 读头数 Reads of <i>MAT1-2</i> idiomorph	
			数量 Number	比例 Ratio (%)	数量 Number	比例 Ratio (%)
YPL6-1	R1	282 375	1 044	0.37	281 331	99.63
	R2	423 669	812	0.19	422 857	99.81
YPL6-3	R1	116 094	115 460	99.45	634	0.55
	R2	358 319	357 378	99.74	941	0.26

检测不到只是因为其核存在的占比极低。根据 2 种核存在占比的不同,会出现 3 种检测结果:一种核占比极多,另一种核占比极少,表现为 PCR 只能检测到一种交配型;一种核占比多,另一种核占比少,表现为 PCR 检测条带一强一弱;2 种核占比相近,则 PCR 能检测到 2 种交配型。

交配位点全长扩增时,虽然是在同一扩增体系中,DNA 模板和引物都相同,但 *MAT1-1* 和 *MAT1-2* idiomorph 的长度有差异,所以扩增效率也会存在差异,且在胶回收、建库及后续测序过程中,2 种分子的得率也会有差异,因此实验数据可能并不能完全准确地反应出这 2 种分子所占的比例,但是却能明确单孢菌株 YPL6-1 和 YPL6-3 其实是异核体单孢萌发菌株,只是这 2 种核分别以较大偏离的比例存在。

3 讨论

本研究通过 *MAT* idiomorph PCR 扩增子的 Nanopore 测序,证实基因组测序和 PCR 检测都只具有一种交配型的梯棱羊肚菌单孢菌株中,另一交配型的核是真实存在的,只不过它的占比极低而已,因此推断那些只检测到一种交配型的单孢菌株,其实也是异核单孢菌株。同时,单子囊中单孢菌株的独立分离及交配型鉴定结果表明:一种交配型的扩增条带强,另一交配型的扩增带弱或无,来自同一子囊中的同类型单孢菌株不会超出 4 个。虽然本研究中只分离了 10 个子囊的子囊孢子,但结果符合 2 个不同核进行核配后形成 8 个子囊孢子的遗传学规律。因此我们推断:梯棱羊肚菌属于一种异核不对称的假同宗结合子囊菌,其子囊中的 8 个子囊孢子,4 个孢子的 *MAT1-1* 型核占比强,*MAT1-2* 型核占比弱;另 4 个孢子的 *MAT1-2* 型核占比强,*MAT1-1* 型核占比弱。在有些孢子萌发后的菌丝中,这种比例会发生改变,出现 2 种核占比相近的现象,即检

测到 2 种交配型都强的单孢菌株。

羊肚菌子囊孢子中存在多个细胞核(Volk & Leonard 1989; 刘伟等 2017a),这些核是同核还是异核并没有直观的检测方法,若为异核它们在单孢中的占比又如何也不能判定,作者试图用交配基因探针对子囊孢子进行原位杂交鉴定(结果未示),未取得成功。无论是基因组测序还是 PCR 扩增,检测到的都是核在孢子萌发后形成的菌丝中的状态。Raju & Perkins (1994)曾报道假同宗子囊菌 *Podospora anserina* 孢子发育时,最初的 2 个异核经有丝分裂后形成 4 个核,每种交配型各 2 个,其中一个核迁移入尾部细胞,最终流失,头部的 3 个细胞核在后期萌发菌丝中,造成 2 种交配型核的比例会偏离 1:1。刘伟等(2017a)观察粗腿羊肚菌 *Morchella crassipes* 子囊孢子萌发过程和细胞核行为时发现,孢子萌发芽管形成时,孢内细胞核以不定数量随机迁移至芽管内并伴随着有丝分裂的发生,芽管细胞呈多核状态。此外,芽管或初生菌丝形成后,子囊孢子内仍保留着大量的细胞核,表明孢子内细胞核并未全部迁移至芽管。梯棱羊肚菌单孢菌株中 2 种交配型核的数量比例存在较大偏离,是由于核流失、核选择性增殖还是其他原因造成不清楚,且这种状态如何在菌丝体增殖和细胞核复制过程中维系下去,目前也没有相关研究。

在本研究中,单孢菌株栽培出菇的子囊果,菌柄组织的交配型比例也会发生偏离。*MAT1-1* 交配型的 YPL6-3 栽培出菇的子囊果菌柄,*MAT1-1-1* 基因强,*MAT1-2-1* 基因弱或无;*MAT1-2* 交配型的 YPL6-1 栽培出菇的子囊果菌柄,*MAT1-2-1* 基因强,*MAT1-1-1* 基因弱或无。而它们的菌盖,则 2 种交配型都强。Du *et al.* (2017)分别检测了梯棱羊肚菌野生和栽培子囊果的菌柄和子实层交配型,发现出现 3 种情况:(1) 菌柄和子实层中 2 种交配型都能找到;(2) 子实层中具有 2 种交配型,但菌柄中只能检测到一

种, *MATI-1* 或者 *MATI-2*; (3) 菌柄和子实层都只检测到一种交配型, 这种子囊果不能产孢。刘伟等(2020)对 348 份来自梯棱羊肚菌、七妹羊肚菌 *M. eximia*、六妹羊肚菌栽培子囊果及野生高羊肚菌 *M. elata* 子囊果的组织分离物作交配基因检测, 发现其中 153 份(43.96%)分离物只检测到一种交配型基因。羊肚菌子囊果组织中除败育的外, 在子实层都能检测到 2 种交配型, 菌柄组织则会发生某一交配型检测不到, 是否也如单孢分离物中是由于存在占比极低的缘故, 还需进一步深入研究。

[REFERENCES]

- Alvarado-Castillo G, Mata G, Sangabriel-Conde W, 2014. Understanding the life cycle of morels (*Morchella* spp.). *Revista Mexicana de Micología*, 40: 47-50
- Chai HM, Chen LJ, Chen WM, Zhao Q, Zhang XL, Su KM, Zhao YC, 2017. Characterization of mating-type idiomorphs suggests that *Morchella importuna*, *Mel-20* and *M. sextelata* are heterothallic. *Mycological Progress*, 16: 743-752
- Chai HM, Chen WM, Zhang XL, Su KM, Zhao YC, 2019. Structural variation and phylogenetic analysis of the mating-type locus in the genus *Morchella*. *Mycologia*, 111(4): 551-562
- Coppin E, Debuchy R, Arnais S, Picard M, 1997. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4): 411-428
- Dai YC, Vainio EJ, Hantula J, Niemelä T, Korhonen K, 2003. Investigations on *Heterobasidion annosum* s. lat. in central and eastern Asia with the aid of mating tests and DNA fingerprinting. *Forest Pathology*, 33: 269-286
- Deamer D, Akeson M, Branton D, 2016. Three decades of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology*, 34: 518-524
- Debuchy R, Turgeon BG, 2006. Mating-type structure, evolution, and function in Euscomycetes. *The Mycota*, 1: 293-323
- Du XH, Yang ZL, 2021. Mating system in true morels (*Morchella*). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(3): 1-23
- Du XH, Zhao Q, Xia EH, Gao LZ, Richard F, Yang ZL, 2017. Mixed-reproductive strategies, competitive mating-type distribution and life cycle of fourteen black morel species. *Scientific Reports*, 7: 1493
- Han M, Wang QS, Baiyintala, Wuhanqimuge, 2019. The whole-genome sequence analysis of *Morchella sextelata*. *Scientific Reports*, 9(1): 15376
- He GQ, 2021. Isolation of single ascospore, identification of mating genes and study on the hyphal fusion of *Morchella importuna*. *China Seed Industry*, 2: 58-62 (in Chinese)
- He PX, Cai YL, Yu FQ, Liu W, 2021. Spatial and temporal disequilibrium of nuclear distribution in heterothallic *Morchella importuna*. *Journal of Agriculture and Food Research*, 6: 100240
- He XS, Zhao M, Wang YZ, Zhang N, Tan RH, Wang Y, Zhu WK, Chen B, 2019. Study on the hyphal fusion and non-fusion phenomena between morels. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 27(4): 244-252 (in Chinese)
- Jain M, Olsen HE, Paten B, Akeson M, 2016. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17(1): 239
- Jiang LL, Qian YH, Ling J, Li TT, Du XH, 2021. The study on mating types of sclerotia in *Morchella*. *Journal of Fungal Research*, 19(4): 255-262 (in Chinese)
- Liu P, Ma YH, Zhao YC, Chai HM, Li Y, 2021. Sexual and vegetative compatibility of single ascospore isolations in the genus *Morchella*. *Acta Edulis Fungi*, 28(1): 40-47 (in Chinese)
- Liu QZ, Ma HS, Zhang Y, Dong CH, 2018a. Artificial cultivation of true morels: current state, issues and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2): 259-271
- Liu W, Cai YL, He PX, Bian YB, 2019. Cultivation of monosporic and hybrid populations and polarity analysis of *Morchella importuna*. *Journal of Fungal Research*, 17(1): 43-49 (in Chinese)
- Liu W, Cai YL, He PX, Bian YB, 2020. Analysis of mating type gene deletion phenomenon in tissue isolates of *Morchella* spp. *Acta Edulis Fungi*, 27(3): 1-6 (in Chinese)
- Liu W, Cai YL, He PX, Zhang Y, Bian YB, 2017a. Ascospore germination and nuclear behavior of *Morchella crassipes*. *Acta Edulis Fungi*, 24(1): 18-20 (in Chinese)
- Liu W, Chen LF, Cai YL, Zhang QQ, Bian YB, 2018b. Opposite polarity monospore genome *de novo* sequencing and comparative analysis reveal the possible heterothallic life cycle of *Morchella importuna*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9): 2525
- Liu W, Zhang Y, He PX, 2017b. Morel biology and cultivation. Jilin Science and Technology Press, Changchun. 1-340 (in Chinese)
- Magi A, Semeraro R, Mingrino A, Giusti B, D'Aurizio R, 2018. Nanopore sequencing data analysis: state of the art, applications and challenges. *Briefings in Bioinformatics*,

- 19(6): 1256-1272
- Nelson MA, 1996. Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. *Trends in Genetics*, 12(2): 69-74
- Ower RD, 1982. Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia*, 74(1): 142-144
- Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz TL, Parks CG, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE, 2007. Ecology and management of morels harvested from the forests of western north America. Pacific Northwest Research Station, General Technical Report. 1-158
- Qin GF, Zhao J, Tian SM, Korhonen K, Dai YC, Liu CR, 2000. New biological species of *Armillaria* in China, *Mycosystema*, 19(4): 509-516 (in Chinese)
- Raju NB, Perkins DD, 1994. Diverse programs of ascus development in pseudohomothallic species of *Neurospora*, *Gelasinospora*, and *Podospira*. *Developmental Genetics*, 15(1): 104-118
- Tan FH, 2019. Expounding the development period of morel cultivation technology using exogenous nutrition bag in China. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 27(4): 257-263 (in Chinese)
- Tan H, Yu Y, Tang J, Liu TH, Miao RY, Huang ZQ, Martin FM, Peng WH, 2021. Build your own mushroom soil: microbiota succession and nutritional accumulation in semi-synthetic substratum drive the fructification of a soil-saprotrophic morel. *Frontiers in Microbiology*, 12: 656656
- Tietel Z, Masaphy S, 2018. True morels (*Morchella*) nutritional and phytochemical composition, health benefits and flavor: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(11): 1888-1901
- Turgeon BG, Yoder OC, 2000. Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 31(1): 1-5
- Volk TJ, Leonard TJ, 1989. Experimental studies on the morel. I. Heterokaryon formation between monoascosporous strains of *Morchella*. *Mycologia*, 81(4): 523-531
- Volk TJ, Leonard TJ, 1990. Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research*, 94(3): 399-406
- Wang Z, Wang HL, Kang ZL, Wu Y, Xing Y, Yang YH, 2020. Antioxidant and anti-tumour activity of triterpenoid compounds isolated from *Morchella* mycelium. *Archives of Microbiology*, 202(7): 1677-1685
- Yuan BH, Li H, Liu L, Du XH, 2021. Successful induction and recognition of conidiation, conidial germination and chlamydospore formation in pure culture of *Morchella*. *Fungal Biology*, 125(4): 285-293
- [附中文参考文献]
- 贺国强, 2021. 梯棱羊肚菌单孢分离、交配型基因鉴定及其菌丝融合杂交研究. *中国种业*, 2: 58-62
- 贺新生, 赵苗, 王亚洲, 张能, 谭仁豪, 王银, 竹文坤, 陈波, 2019. 羊肚菌菌丝间融合与不融合现象研究. *食药菌*, 27(4): 244-252
- 蒋林林, 钱宇洪, 凌嘉, 李亭廷, 杜习慧, 2021. 羊肚菌菌核的交配型. *菌物研究*, 19(4): 255-262
- 刘萍, 马渊浩, 赵永昌, 柴红梅, 李玉, 2021. 羊肚菌单孢菌株的性亲和与营养体亲和特性. *食用菌学报*, 28(1): 40-47
- 刘伟, 蔡英丽, 何培新, 边银丙, 2019. 梯棱羊肚菌单孢及杂交群体的栽培出菇试验和极性分析. *菌物研究*, 17(1): 43-49
- 刘伟, 蔡英丽, 何培新, 边银丙, 2020. 羊肚菌组织分离物交配型基因缺失现象分析. *食用菌学报*, 27(3): 1-6
- 刘伟, 蔡英丽, 何培新, 张亚, 边银丙, 2017a. 粗腿羊肚菌子囊孢子萌发过程及其细胞核行为. *食用菌学报*, 24(1): 18-20
- 刘伟, 张亚, 何培新, 2017b. 羊肚菌生物学与栽培技术. 长春: 吉林科学技术出版社. 1-340
- 秦国夫, 赵俊, 田淑敏, Korhonen K, 戴玉成, 刘春如, 2000. 中国蜜环菌的新物种. *菌物系统*, 19(4): 509-516
- 谭方河, 2019. 阐释我国羊肚菌外营养袋栽培技术的发展历程. *食药菌*, 27(4): 257-263