

# 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

贺国强

(北京市农业技术推广站,北京 100029)

**摘要:** 选用3个梯棱羊肚菌(*Morchella importuna*)的栽培菌株( $F_0$ ),采取显微操作法从其正常出菇的子囊果获得 $F_1$ 单孢群体,研究 $F_1$ 单孢群体交配型基因分型及菌丝生理特性,进行不同交配型的 $F_1$ 单孢平皿混合配对试验,筛选出杂交子。结果表明:显微操作可以有效获得单孢菌株,成功率达35.34%;相比较MAT1/MAT2引物对,利用P8/P6引物对可以较好地扩增出MAT1-1-1、MAT1-2-1基因,从而区分出单孢的交配型基因类型,检出率达87.5%;选取部分不同交配型的 $F_1$ 单孢进行平皿混合配对,筛选出1株杂交菌株,为羊肚菌单孢杂交育种奠定了基础。

**关键词:** 梯棱羊肚菌;单孢分离;交配型基因;菌丝融合

梯棱羊肚菌(*Morchella importuna*)属于子囊菌门(Ascomycota)、盘菌亚门(Pezizomycotina)、盘菌纲(Pezizomycetes)、盘菌目(Pezizales)、羊肚菌科

(Morchellaceae)、羊肚菌属(*Morchella* Dill.Ex Pers.: Fr.),是一类珍稀野生的名贵食用菌。羊肚菌的驯化栽培吸引着大批蘑菇爱好者投身其中。目前羊肚菌室内栽培和室外大田栽培模式均取得了一定成功,对于羊肚菌产业化具有重要意义<sup>[1-3]</sup>。自2012

基金项目: 2020年北京市农业技术推广站预算项目(PXM2020000038)

## 3 结论与讨论

彩色马铃薯和胃调中、健脾益气、强身益肾,用途广泛,不仅可作为特色蔬菜,增加市场花色品种,丰富人们的菜篮子,而且可作为特色食品开发,可炸出具有天然色彩的薯片、薯条等休闲食品<sup>[2]</sup>。仇菊等<sup>[3]</sup>研究报道,通过对黑金刚、红美鲜薯的主要营养成分分析发现,彩色马铃薯的维生素C含量较普通马铃薯高,基本营养成分及矿物质含量与普通马铃薯没有太大差异。彩色马铃薯别样的颜色赋予了其额外的食用价值,花青素是彩色马铃薯有别于普通马铃薯的一大营养特点,花青素提取物具有调节脂质代谢、抗氧化、抗癌等功效,因此食用彩薯对健康有益。

通过2年引种试验测定,2019年甘肃马铃薯产量普遍高于上年,与当年降水偏多、气候冷凉、适宜马铃薯生长有关。黑金刚和红美2个品种中早熟,单株生产力高,可在甘肃高寒阴湿旱作雨养区示范种植,推动特色马铃薯产业发展。

甘肃高寒阴湿区种植的主要是普通马铃薯<sup>[4-5]</sup>,彩色马铃薯种植鲜见报道,黑金刚品种紫皮紫肉、红美品种红皮粉红色薯肉,是中早熟品种,色泽鲜靓,风格别样,作为普通马铃薯的搭配品种种植很有意义。该区播种一般在4月中下旬进行,施足底肥,适时追肥,培土起垄,生长后期注意防控晚疫病,8月上中旬收获。播种密度控制在4000株/667m<sup>2</sup>左右。

## 参考文献

- [1] 仇菊,刘鹏,孙君茂.彩色马铃薯营养保健功能及其食品开发研究进展.食品与机械,2016,32(10):226-229
- [2] 郭赵娟,吴焕章.彩色马铃薯营养价值与主要品种.现代农业科技,2008,17(7):107-109
- [3] 仇菊,朱宏,刘鹏,王靖,孙君茂.我国彩色马铃薯主栽品种的营养成分分析.中国食物与营养,2018,24(11):10-14
- [4] 李永成.高寒阴湿区马铃薯种薯基地建设模式探析.中国种业,2018(7):44-47
- [5] 陆立银,王敏,吕和平,徐福祥,陈富.甘肃渭源县杜家铺村产业现状及马铃薯应用实践.中国种业,2020(2):37-40

(收稿日期:2020-11-23)

年我国羊肚菌进入了产业化时期,种植面积由最初的 200hm<sup>2</sup>,迅速增长到了 4667hm<sup>2</sup> 左右。但羊肚菌属于子囊菌,菌种易退化,加之其生理及遗传研究基础薄弱,造成了羊肚菌栽培的不稳定性,无法稳定盈利,限制着羊肚菌产业的健康和稳定发展。

目前羊肚菌栽培的菌株普遍采用组织分离的方法获得,但随着组织分离、转代次数的增加等因素影响,会导致菌株中的其中一种交配型基因逐渐减少或衰退,造成减产或无法出菇<sup>[4-5]</sup>。因此,建立羊肚菌的单孢杂交育种方法对于羊肚菌品种选育至关重要。不同于担子菌的杂交育种通常以单孢之间拮抗线处的锁状联合作为标记,属于子囊菌的羊肚菌菌丝没有明显的锁状结合,需要另外特定的标记以确定是否杂交成功。真菌的交配型基因是控制性发育的 1 个基因簇位点。子囊菌中通常含有 2 种类型的交配型位点即 *Mat1-1* 和 *Mat1-2*,如果 2 个交配型位点位于同 1 个细胞核内,即可在分子层面认定为同宗结合真菌;反之如果分布在不同的细胞核上,则被认定为异宗结合真菌,交配型位点的序列没有同源性,但调节着近等的功能,位点两侧有保守的基因序列,因此称为 *idiomorph*<sup>[6-8]</sup>。近年来通过对交配型基因(*Mat1-1* 或 *Mat1-2*)的研究,认为目前已被驯化栽培的梯棱羊肚菌(*M.importuna*)和六妹羊肚菌为异宗结合真菌,梯棱羊肚菌的子囊孢子虽为多核体,但为同核体<sup>[9]</sup>。基因组数据也表明,梯棱羊肚菌的交配型基因是单拷贝基因<sup>[6,10-11]</sup>,可以直接将其作为 1 种共显性核型标记使用。

收集梯棱羊肚菌亲本菌株(*F<sub>0</sub>*)的单孢群体(*F<sub>1</sub>*),利用显微操作法分离获得单孢菌株,并对 *F<sub>1</sub>* 单孢群体交配型进行测定,随后对 *F<sub>1</sub>* 群体间进行实验室条件下的随机配对杂交,获得 *F<sub>x</sub>* 菌株,以期为羊肚菌育种工作提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 供试菌株** 梯棱羊肚菌栽培菌株 M-15、M-CY、M-HM (*F<sub>0</sub>* 亲本菌株)源自商业化栽培菌株和野生驯化菌株,保存于北京市农业技术推广站食用菌实验室。采用形态学特征结合 ITS 序列分析确证是梯棱羊肚菌。利用自然弹射法收集羊肚菌的子囊孢子。

**1.2 单孢分离及纯化** 采用显微操作技术分离羊肚菌单个子囊孢子。首先采用 50% 的无菌甘油溶

液将孢子稀释至 100 万个 /mL,取 50μL 涂布于无菌载玻片,将载玻片置于倒置相差显微镜;用拉针仪或手工制备挑针,将做好的毛细管挑针拿在操作手臂上,缓慢将挑针移动至显微镜视野内,在视野下用毛细管挑针吸住分散的单个子囊孢子,抬针,将吸取的子囊孢子在无菌操作环境下转移(小洗耳球吹出)至 CYM 完全培养基(酵母粉 2g/L、蛋白胨 2g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.5g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46g/L、葡萄糖 20g/L、琼脂 20g/L,加无菌水至 1L)平板,置于 23℃ 避光培养,约 36~48h 可见萌发形成的单菌落。肉眼观察平皿内菌丝,并使用显微镜进行观察,若明显由一个子囊孢子萌发形成辐射状菌丝,基本可视为单孢菌株。无菌操作及时切取菌丝生长末端的单根菌丝,转接至新的培养基内,即获得纯化的单孢菌丝。单孢群体 *F<sub>1</sub>* 编号为 *F<sub>1</sub>* (*M*) *n*,*M* 表示亲本菌株名称,*n* 为数字编号,代表第 *n* 个单孢。

**1.3 交配型基因的测定** DNA 的提取中,*F<sub>0</sub>* 亲本菌株、*F<sub>1</sub>* 单孢群体均为纯培养的菌丝体。菌丝体或组织块经液氮研磨后,用裂解液(CTAB 2%、PVP 2%、Tris-HCl 100mmol/L、EDTA 20mmol/L、NaCl 1.4mol/L)裂解获得 DNA 粗提液,经 V(苯酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1 去蛋白后再经乙醇沉淀、RNAase 消解去除 RNA 污染,最终获得纯净 DNA,稀释至 50ng/μL,4℃ 储存备用。

交配型基因的扩增引物为 MAT1、MAT2<sup>[10]</sup>,P8-4、P6-1<sup>[12]</sup>,PLiu1、PLiu2。其中引物对 MAT1F/R、P8-4F/P8-4R、PLiu1F/R 用于检测交配型 *MAT1-1-1*,引物对 MAT2F/R、P6-1F/P6-1R、PLiu2F/R 用于检测交配型 *MAT1-2-1*。P8-4F 的核苷酸序列为 5'-GCTCTCTTGTGCCCTTTTGACTAT-3',P8-4R 的核苷酸序列为 5'-TCTACCAGCCATGTGAAACAAGCAA-3';P6-1F 的核苷酸序列为 5'-GAGACTCAAATCTGACTGACTTCCT-3',P6-1R 的核苷酸序列为 5'-GAAGAACCTCAGATAAGCGTAAAAT-3'。扩增的目的片段大小分别为 1837bp 和 1740bp,分别代表 *MAT1-1-1* 和 *MAT1-2-1* 交配型基因序列全长。25μL 扩增体系包括 2×PCRmix (TSINGKE Bio Inc) 12.5μL,10μmol/L 的 P8-4F、P8-4R 引物各 1μL,DNA 模板 1μL,ddH<sub>2</sub>O 9.5μL。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 3min;94℃ 变性 30s,60℃ 退火 30s,72℃ 延伸 90s,30 个循环;72℃ 延伸 10min。

所有扩增产物在 1.2% (W/V) 琼脂糖凝胶上电泳检测。

**1.4  $F_1$  单孢群体菌丝生长特性测定** 直接用肉眼观察菌落特征, 主要包括菌丝生长整齐度、颜色、菌核数量。菌丝日均长速的测定: 当菌丝体培养到第  $N$  天 (96h) 时 (以菌丝将近长满平皿而未长满平皿时作为测量终点), 以接种块为中心用刻度尺测量菌落直径 (mm), 随机测量 4 次, 取平均值。菌丝日均长速的计算方法: 菌丝日均长速 (mm/d) =  $Y$  (菌落直径 - 8mm)  $\div$  2  $\div$  培养天数 (d)。最后取 5 个重复的平均值。

**1.5  $F_1$  单孢群体平皿内融合** 按照 Volk 等<sup>[13]</sup> 的单孢融合方法, 将基因型分别为 *MAT1-1-1* 和 *MAT1-2-1* 型的单孢分为一组。在 90mm 直径的 PDA 平板内均分 4 个区, 分别从 *MAT1-1-1* 和 *MAT1-2-1* 型组单孢选出 2 个单孢菌丝, 不同交配型基因按对角线均等排列 (为了减少平皿个数), 菌丝块圆柱体的直径约 0.5cm, 菌丝块之间的距离约为 4cm。将接种好的各单孢子菌株继续于 25℃ 恒温培养, 至菌丝体长至两两之间相互交汇, 观察现象并记录。

**1.6 杂交融合  $F_1$  菌株的筛选、鉴定** 从菌丝交汇处隆起部位挑取 0.2cm  $\times$  0.2cm 接种于新的 PDA 平皿内, 25℃ 恒温培养, 然后检测其交配型基因类型, 若同时含有 *MAT1-1-1* 和 *MAT1-2-1* 型基因, 则可能是杂交融合子。将同时含有 *MAT1-1-1* 和 *MAT1-2-1* 型基因的疑似融合菌株与相应的亲本  $F_1$  单孢菌株接种于同一个 PDA 平皿内, 观察其有无拮

抗线, 若疑似融合菌株与相应的亲本  $F_1$  单孢菌株两两间都有拮抗线存在, 则表明杂交成功。

## 2 结果与分析

**2.1 单孢分离及纯化** 待单孢菌丝刚刚萌发时, 挑取单根菌丝, 接种于新的 CYM 平板, 编号, 进行培养。共挑取 399 个单孢, 萌发获得并纯化得到 141 个单孢菌株, 成功率 35.34%。3 个亲本菌株的  $F_1$  单孢挑取成功率差别较大 (表 1),  $F_1$  (M-CY) 的单孢挑取成功率最低, 仅为 26.92%;  $F_1$  (M-15)、 $F_1$  (M-HM) 的单孢挑取成功率较高, 均达到 40% 以上, 可能与各亲本菌株的  $F_1$  单孢的活力有关, 从而直接影响了单孢的萌发率, 进而影响了单孢挑取的成功率。

表 1 显微操作法挑取单孢的成功率统计

| 亲本菌株 ( $F_0$ ) | 分离单孢数 | 单孢萌发数 | 成功率 (%) |
|----------------|-------|-------|---------|
| M-15           | 98    | 40    | 40.82   |
| M-CY           | 208   | 56    | 26.92   |
| M-HM           | 93    | 45    | 48.39   |

**2.2  $F_1$  单孢群体菌丝生理特性** 由表 2 可知, 同一亲本获得的单孢群体, 在菌丝生长、产生色素方面存在差别。 $F_1$  (M-15) 有 1 株单孢产黄褐色色素,  $F_1$  (M-CY) 有 3 株单孢产黄褐色色素,  $F_1$  (M-HM) 无单孢产黄褐色色素, 但有 17 株单孢产灰褐色色素。综合来看, 不产色素的菌株最多, 占比 84.8%, 产黄褐色色素的菌株占比 2.9%, 产灰褐色色素的菌株占比 12.3%。

表 2 基于 PDA 上的培养特征的单孢菌株分组

| 培养形态         | 菌株           |              |              | 总株数 | 比例 (%) |
|--------------|--------------|--------------|--------------|-----|--------|
|              | $F_1$ (M-15) | $F_1$ (M-CY) | $F_1$ (M-HM) |     |        |
| 菌丝白色         | 38           | 53           | 26           | 117 | 84.8   |
| 菌丝白色, 产黄褐色色素 | 1            | 3            | 0            | 4   | 2.9    |
| 菌丝白色, 产灰褐色色素 | 0            | 0            | 17           | 17  | 12.3   |

由表 3 可知, 同一亲本获得的单孢群体, 单孢的生长速率差别也很大。 $F_1$  (M-CY) 的最小生长速率值最小, 为 0.85cm/d,  $F_1$  (M-HM) 的最大生长速率值最大, 为 1.93cm/d, 而 3 个单孢菌株的平均生长速率相差不大, 分别为 1.49cm/d、1.46cm/d、1.53cm/d。

表 3 单孢菌丝生长速率 (cm/d)

| 菌株           | 最小生长速率值 | 最大生长速率值 | 生长速率平均值 |
|--------------|---------|---------|---------|
| $F_1$ (M-15) | 0.98    | 1.90    | 1.49    |
| $F_1$ (M-CY) | 0.85    | 1.75    | 1.46    |
| $F_1$ (M-HM) | 0.88    | 1.93    | 1.53    |

**2.3  $F_1$  单孢群体的分型** 不同引物对的特异性存在较大差别。由表 4 可知,相比较使用 MAT1F/R、MAT2F/R 引物对,利用 P8-4F/P8-4R、P6-1F/P6-1R 引物对可以较好地扩增出 *MAT1-1-1*、*MAT1-2-1* 基因,用于区分出单孢的交配型基因类型,检出率达 87.5%,基本与使用 PLiu1F/R、PLiu2F/R 引物对结果一致,因此,采用 P8-4F/P8-4R、P6-1F/P6-1R 引物对扩增交配型基因。

利用改进的特性引物(P8-4F/P8-4R、P6-1F/P6-1R)进行 PCR 扩增,检测单孢菌株的交配型基

因。由表 5 可知,共完成 93 株单孢菌株的交配型基因分型,经统计分析,*MAT1-1-1* 与 *MAT1-2-1* 型单孢菌株数分别为 37 株和 51 株,比例为 0.73:1。其中  $F_1$  (M-15)、 $F_1$  (M-CY)、 $F_1$  (M-HM) 基因型为 *MAT1-1-1* 型的菌株数分别为 15 株、14 株、8 株,基因型为 *MAT1-2-1* 型的菌株数分别为 22 株、15 株、14 株。仅有  $F_1$  (M-CY) 中 1 株菌株未检测出交配型基因类型。 $F_1$  (M-15) 中 4 株菌株同时检测出两种交配型基因类型,重复试验结果依然如此,可能这 4 株菌株为混合孢子,非单孢。

表 4 不同引物对单孢菌株的交配型基因的检出统计

| 引物对         | $F_1$ (M-CY)<br>1 | $F_1$ (M-15)<br>1 | $F_1$ (M-15)<br>3 | $F_1$ (M-15)<br>5 | $F_1$ (M-15)<br>6 | $F_1$ (M-15)<br>7 | $F_1$ (M-15)<br>8 | $F_1$ (M-15)<br>9 | 检出率<br>(%) |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| MAT1F/R     | ×                 | ×                 | ×                 | ×                 | ×                 | ×                 | ×                 | ×                 | 25         |
| MAT2F/R     | ×                 | √                 | ×                 | ×                 | ×                 | ×                 | √                 | ×                 |            |
| P8-4F/P8-4R | ×                 | √                 | √                 | √                 | √                 | √                 | ×                 | √                 | 87.5       |
| P6-1F/P6-1R | √                 | √                 | ×                 | ×                 | ×                 | ×                 | √                 | ×                 |            |
| PLiu1F/R    | ×                 | ×                 | √                 | √                 | √                 | √                 | ×                 | √                 | 87.5       |
| PLiu2F/R    | √                 | √                 | ×                 | ×                 | ×                 | √                 | √                 | ×                 |            |

× 表示未扩增出基因片段,√表示扩增出基因片段

表 5 单孢菌株的交配型基因分型统计

| 菌株           | <i>MAT1-1-1</i> 型(株) | <i>MAT1-2-1</i> 型(株) | 比例     | 双型(株) | 未鉴定出(株) |
|--------------|----------------------|----------------------|--------|-------|---------|
| $F_1$ (M-15) | 15                   | 22                   | 0.68:1 | 4     | 0       |
| $F_1$ (M-CY) | 14                   | 15                   | 0.93:1 | 0     | 1       |
| $F_1$ (M-HM) | 8                    | 14                   | 0.57:1 | 0     | 0       |
| 总计           | 37                   | 51                   | 0.73:1 | 4     | 1       |

**2.4 单孢菌株间融合表现** 将已鉴定的不同交配型基因单孢菌株接种于同一平板,使菌丝接触,发生融合。初步共完成配对 408 个组合。挑取不同交配型基因单孢接触的融合带,接种于新的 PDA 平板,待菌丝刚萌发,挑取单根菌丝。由表 6 可以看出,菌

株之间两两生长接触,表现出 3 种融合类型:(1)有融合带(隆起),无色素;(2)有融合带(隆起),产生褐色色素;(3)无融合带,两菌株菌丝互相渗透生长。其中第 2 种融合类型最多,占比 43.4%,第 3 种融合类型最少,占比仅为 16.9%。

表 6 不同交配型单孢菌株的平皿杂交统计

| 融合类型     | 配对菌株举例                                                             | 配对数量(对) | 占比(%) |
|----------|--------------------------------------------------------------------|---------|-------|
| 有隆起,无色素  | $F_1$ (M-HM) 2 × $F_1$ (M-CY) 1, $F_1$ (M-HM) 2 × $F_1$ (M-HM) 3   | 162     | 39.7  |
| 有隆起,产褐色素 | $F_1$ (M-CY) 1 × $F_1$ (M-HM) 3, $F_1$ (M-HM) 13 × $F_1$ (M-CY) 16 | 177     | 43.4  |
| 菌丝渗透生长   | $F_1$ (M-HM) 2 × $F_1$ (M-CY) 16, $F_1$ (M-CY) 7 × $F_1$ (M-HM) 15 | 69      | 16.9  |

**2.5 单孢融合菌株的鉴定** 将挑取的融合菌株,分别与母本进行拮抗试验,与亲本菌株都存在拮抗的菌株可能是杂交菌株。将与亲本菌株都存在拮抗

的融合带菌株进行 PCR,测序,鉴定交配型基因类型。鉴定出  $F_1$  (M-CY) 2 ×  $F_1$  (M-15) 8 同时含有 *MAT1-1-1* 型和 *MAT1-2-1* 型基因,为融合子。



### 3 结论与讨论

采用显微操作技术从3株梯棱羊肚菌栽培菌株( $F_0$ )的子囊孢子群体( $F_1$ )中分离出单个孢子,进而获得单孢菌株,并且单孢分离效率较高,达35.34%。显微单孢分离技术尤其适合孢子较大的羊肚菌,单孢分离成功率较稀释涂布法高。羊肚菌的子囊孢子较大,约十几个微米,且识别度高,便于进行显微操作。此外,相较于稀释涂布法分离单孢,显微操作在稀释倍数合适的情况下,即每个视野内2~3个单孢,可以较好地排除两个或多个子囊孢子的粘连(稀释法易发生),确保分离得到的是单个孢子。 $F_1$ 单孢群体交配型基因分型结果表明,在随机挑选的93株单孢分离菌株中,交配型基因分型仅有4株菌株同时检测出两种交配型基因类型,可能这4株菌株为混合孢子,相较于一般的稀释法(成功率小于30%)单孢挑取分离成功率很高。

$F_1$ 单孢群体的菌丝生理特性研究表明,不同单孢的菌丝生长速率差别较大,最小的生长速率和最大的生长速率可相差1倍。主要是由于子囊孢子是先经过减数分裂,而后再进行一次有丝分裂形成的,基因出现了随机组合,一个子囊内的8个子囊孢子有4种基因型,而由于存在多个基因位点,理论上减数分裂得到的子囊孢子的基因型都不完全相同<sup>[14]</sup>。因此,分离到的单孢间可能存在差异,表现在菌丝生长速率、菌丝形态、产生色素等方面。

不同交配型基因扩增引物对的特异性存在较大差别。不同于Du等<sup>[10]</sup>使用扩增引物MAT1F/R、MAT2F/R对14株黑色羊肚菌进行交配型基因的分型,本研究利用P8-4F/P8-4R、P6-1F/P6-1R引物对可以扩增出MAT1-1-1、MAT1-2-1基因,较好地地区分出单孢的交配型基因类型,检出率达87.5%。这可能与引物与交配型基因的DNA序列结合的特异性有关。

基于交配型基因的单孢分型,尤其适合于遗传背景不完备、基因标记缺乏的子囊菌的遗传标记。本研究中,不同交配型的 $F_1$ 单孢平皿配对试验,成功筛选出1个杂交子,为羊肚菌单孢杂交育种工作奠定了基础。但在平皿内进行单孢杂交,仅仅依靠交配型基因标记难度较大,如何判断杂交融合成功、如何有效筛选是难点。现有的基于拮抗反应和交配

型基因的PCR法,工作量大;而且基于交配型基因的融合观察,存在拮抗的干扰;同时挑取融合带中融合菌丝,存在亲本菌丝的干扰,难度较大,效果依然不太理想。因此,需进一步研究有效的筛选标记以提高筛选效率。

### 参考文献

- [1] Ower R D. Notes on the development of the morel ascocarp : *Morchella esculenta*. Mycologia, 1982, 74 ( 1 ): 142-144
- [2] Ower R D, Mills G L, Malachowski J A. Cultivation of *Morchella* : US, 4594809. 1986-06-17
- [3] 刘伟, 张亚, 蔡英丽. 我国羊肚菌产业发展的现状及趋势. 食用菌, 2017, 25 ( 2 ): 77-83
- [4] 刘伟, 蔡英丽, 何培新, 边银丙. 羊肚菌组织分离物交配型基因缺失现象分析. 食用菌学报, 2020, 27 ( 3 ): 1-6
- [5] 曾婷婷. 羊肚菌菌种的交配型研究. 长沙: 湖南师范大学, 2019
- [6] Chai H M, Chen L J, Chen W M, Zhao Q, Zhang X L, Su K M, Zhao Y C. Characterization of mating-type idiomorphs suggests that *Morchella importuna*, Mel-20 and *M. sextelata* are heterothallic. Mycological Progress, 2017, 16: 743-752
- [7] Liu W, Chen L F, Cai Y L, Zhang Q, Bian Y B. Opposite polarity monospore genome de novo sequencing and comparative analysis reveal the possible heterothallic life cycle of *Morchella importuna*. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19 ( 9 ): 2525
- [8] Metzenberg R L, Glass N L. Mating type and mating strategies in *Neurospora*. BioEssays, 1990, 12 ( 2 ): 53-59
- [9] He P X, Wang K, Cai Y L, Liu W. Live cell confocal laser imaging studies on the nuclear behavior during meiosis and ascosporeogenesis in *Morchella importuna* under artificial cultivation. Micron, 2017, 101: 108-113
- [10] Du X H, Zhao Q, Xia E H, Gao L Z, Richard F, Yang Z L. Mixed-reproductive strategies, competitive mating-type distribution and life cycle of fourteen black morel species. Scientific Report, 2017, 7 ( 1 ): 1493
- [11] Chai H M, Chen W M, Zhang X L, Su K M, Zhao Y C. Structural variation and phylogenetic analysis of the mating-type locus in the genus *Morchella*. Mycologia, 2019, 111 ( 4 ): 551-562
- [12] 柴红梅, 赵永昌, 陈卫民, 张小雷, 苏开美, 刘萍, 陈立娇. 鉴定梯棱羊肚菌交配型的方法和特异引物对: 中国, 106282396B. 2019-05-28
- [13] Volk T J, Leonard T J. Experimental studies on the morel. I. Heterokaryon formation between monoascoporous strains of *Morchella*. Mycologia, 1989, 81 ( 4 ): 523-531
- [14] 刘伟, 张亚, 何培新. 羊肚菌生物学与栽培技术. 长春: 吉林科学技术出版社, 2017

( 收稿日期: 2020-11-19 )