中国“黑块菌”(黑松露)新分布区确认及物种多样性保护

陈娟^{1*}, 李淑超^{1,2}, 李佳梅¹, 阎波¹, 刘培贵^{2*}

1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

2. 中国科学院昆明植物研究所东亚植物多样性与生物地理学重点实验室, 昆明 650204

* 联系人, E-mail: kibchenjuan@126.com; pgliu@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2017-08-23; 接受日期: 2017-10-12; 网络版发表日期: 2017-11-03

国家自然科学基金委员会与云南省人民政府联合基金项目(批准号: U1202262)、国家自然科学基金(批准号: 81573527, 30470011)、云南省科技创新强省计划(批准号: 2009AC013)和中国科学院东亚生物多样性与生物地理学重点实验室项目(批准号: 0806361121)资助

摘要 以印度块菌复合群(*Tuber indicum* complex)为代表的中国“黑块菌”主要分布于我国西南地区(云南和四川), 是块菌属在我国产量最大, 分布最广的野生贸易食用菌种类。在最近一次块菌资源野外调查中, 发现河北省遵化地区人工种植的板栗(*Castanea mollissima* BL.)林下有大量的“黑块菌”产生。形态学及分子系统学分析结果显示, 新发现的“黑块菌”与已报道的台湾块菌 *T. formosanum* 及印度块菌 *T. indicum* 亲缘关系较近, 结合其地理分布、共生树种等特点, 本文将其作为 *T. indicum* 的一个生态类型处理。这是 *T. indicum* 在其主产区(我国西南地区)之外的地区首次大量发现, 其新分布区的发现为全面系统地解析中国的块菌类群在全球块菌属的起源、演化中的重要作用提供新的参考, 同时对我国块菌人工种植有着重要意义。此外, 鉴于中国“黑块菌”及其印度块菌复合群的经济重要性、分类的复杂性及保护的迫切性, 本文对该类真菌研究现状及野生资源状况做了阐述, 并提出了相应的保护和利用发展措施, 为该类珍稀濒危食药真菌资源的保护和合理利用提供更加全面的资料信息。

关键词 印度块菌复合群, 中华夏块菌, 河北地区, 生态保护

块菌属(*Tuber* F. H. Wigg)是子囊菌门(Ascomycota)中一类地下生的大型真菌, 其能与松科(Pinaceae)、壳斗科(Fagaceae)、榛科(Corylaceae)、桦木科(Betulaceae)等木本植物形成典型的外生菌根共生关系^[1]。块菌(块菌属成员的简称)在商业上称为“松露”, 依据其子囊果表面的颜色被分为“黑块菌”(黑松露)和“白块菌”(白松露), 即子囊果表面黑褐色或以暗色为主, 且表面具有明显瘤突的为“黑块菌”; 子囊果表面白

色或以淡色为主, 光滑或具有不明显疣突的为“白块菌”。块菌属一些种类是著名的食药真菌, 如法国的黑孢块菌(*T. melanosporum* Vittad.)、意大利白块菌(*T. magnatum* Picco), 因其具有独特的香味, 备受国际美食界的恩宠^[2]。

中国“黑块菌”(Chinese black truffle)泛指在东亚尤其是中国发现的块菌属中子囊果表面黑色、具有明显瘤突的种类, 主要包括印度块菌(*T. indicum* Cooke &

引用格式: 陈娟, 李淑超, 李佳梅, 等. 中国“黑块菌”(黑松露)新分布区确认及物种多样性保护. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 319–331
Chen J, Li S C, Li J M, et al. Distribution, biological diversity, and conservation of Chinese black truffle (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 319–331, doi: 10.1360/N052017-00043

Massee)、喜马拉雅块菌(*T. himalayense* B.C. Zhang & Minter)^[3]、中国块菌(*T. sinense* K. Tao & B. Liu)^[4]、假喜马拉雅块菌(*T. pseudohimalayense* G. Moreno, Manjón, J. Díez & García-Mont.)^[5]和台湾块菌(*T. formosanum* H.T. Hu & Y. Wang)^[6] 5个种组成的印度块菌复合群(*T. indicum* complex)以及假凹陷块菌(*T. pseudoexcavatum* Y. Wang, G. Moreno, Rioussset, Manjón & G. Rioussset)^[7]和中华夏块菌(*T. sinoastivum* J.P. Zhang & P.G. Liu)^[8]。*Tuber sinoastivum*子囊孢子表面具有明显的网纹,但因其子囊果黑色,表面具有多角形瘤突,有时也易与*T. indicum* complex混淆。*Tuber pseudoexcavatum*褐色的具有锥状疣突的子囊果也常与*T. indicum* complex混合出售或出口。

Tuber indicum complex是块菌属中在我国分布最广,产量最大且大宗出口的野生贸易食用菌种类,也是亚洲地区特有的,且主产于我国的块菌属商品种类,在我国山地林区俗称“无娘藤”、“土菇”、“松茅茯苓”、“猪拱菌”等。块菌不仅具有极高的经济价值,而且药用价值也广受关注。现代研究表明,块菌子实体含有丰富的块菌多糖、 α -雄烷醇(androstenol)、神经酰胺及芳香性化合物等多种生物活性物质,其具有增强免疫力、抗衰老、抗肿瘤、止血调节女性月经周期和性功能等作用^[9]。

过去10余年的调查结果显示,中国“黑块菌”主要分布于我国西南地区,台湾地区也有零星分布。最近一次的块菌野外资源调查发现,该类群在河北省遵化地区有大量子囊果产生,这是首次在块菌主产区(我国西南地区)之外发现大量的中国“黑块菌”,形态学和分子系统学的分析结果显示新发现的块菌应属印度块菌复合群。

1 材料与方法

1.1 材料

研究材料为2016年9月23日,10月26日两次采自河北省遵化市兴旺寨乡(北纬40.24°,东经117.86°;海拔73 m),15年树龄的板栗林下土壤中的块菌标本以及近年来在我国西南地区发现的“黑块菌”标本。标本信息详见表1。凭证标本存于中国科学院昆明植物研究所隐花植物标本馆(KUN-HKAS)。

1.2 方法

(1) 野外考察、标本采集及分布区分析。在每年的块菌采收季(9~12月),选择西南地区(云南、四川)、东北地区(黑龙江)、西北地区(甘肃)和华北地区(河北)等块菌物种丰富的省区或早期文献报道有块菌记录的地区开展野外考察,采集并记录块菌标本,记录其分布地点及可能形成共生关系的高等植物。根据过去15年本课题组开展的全面系统的块菌资源调查结果^[10~14]及标本馆藏标本记录(中国科学院昆明植物研究所隐花标本馆KUN-HKAS,中国科学院微生物所标本馆HMAS,中国科学院沈阳应用生态所标本馆IFS)及近5年新增的块菌种类文献资料^[15~18],分析块菌属种类及其地理分布特点,绘制该属在我国的主要地理分布图。

(2) 形态学观察。采用经典的形态学鉴定方法,观察新鲜标本的子囊果外部特征、质地;产孢组织的颜色,菌脉的疏密等宏观特征;微观观察采用双面刀片取不同部位的组织作徒手切片,置于5% KOH溶液中静置片刻待组织恢复后,在Nikon E400型光学显微镜(日本)下观察、测量;观察的显微特征主要包括包被的组织类型;子囊的形状、大小、是否具柄、成熟时所含的子囊孢子数目;成熟子囊孢子的大小、形状、表面纹饰等。子囊孢子的大小依据子囊所含孢子数目的不同分别测量其长度和宽度,表面纹饰不计在内(一般随机测量至少40个成熟孢子)。子囊孢子的长或宽以 $(a)b-c(d)$ 表示,90%的测量数值落在 $b-c$ 之间, a , b 分别表示测量数据的最大和最小值。子囊孢子的长宽比用 Q 表示,黑体 Q 则表示子囊孢子长宽比的算术平均值的标准差^[19]。

(3) DNA提取、测序及序列分析。取新鲜子囊果100 mg,液氮研磨成粉末状,采用真菌DNA提取试剂盒(E.Z.N.ATM Fungal DNA Kit, Omega Bio-Tek, USA)进行DNA提取。DNA提取及PCR扩增步骤参照以前的研究^[20]。核糖体内转录间隔区(internal transcribed space, ITS)全序列及核糖体大亚基(nuclear large subunit ribosomal DNA, LSU)部分序列用做分子鉴定标记,引物分别用ITS5/ITS4及LR0R/LR5。25 μ L PCR扩增体系包含12.5 μ L 2 $\times$ PCR mix (TaKaRa, 日本),0.5 μ L引物(10 μ mol/L),2 μ L DNA模板,9.5 μ L ddH₂O。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸7 min,4 $^{\circ}$ C保存。1%琼

表 1 用于系统发育分析的块菌属种类、凭证标本及采集地信息^{a)}

物种学名	样品编号	凭证标本号	采集地	宿主树种学名	GenBank Accession (ITS)	GenBank Accession (LSU)
<i>Tuber aestivum</i>	E1		阿布鲁佐大区, 意大利	未知	AF516788	
<i>T. aestivum</i>	E17		阿布鲁佐大区, 意大利	未知	AY226042	
<i>T. aestivum</i>			法国			HE601926
<i>T. aestivum</i>			法国			HE601927
<i>T. borchii</i>			匈牙利	未知		JF261348
<i>T. brumale</i>			法国		DQ329360	
<i>T. brumale</i>			法国	未知	AF132504	
<i>T. excavatum</i>		Trappe 19457	未知	未知		DQ191677
<i>T. excavatum</i>		HKAS52006	会东, 四川省	<i>Pinus armandii</i>		GU979140
<i>T. formosanum</i> *		HKAS62628	台湾	<i>Cyclobalanopsis glauca</i>	JN655530	
<i>T. formosanum</i> *	T12	HKAS48268	台湾	<i>C. glauca</i>	GU979048	
<i>T. formosanum</i> *	T44	HKAS49707	台湾	<i>C. glauca</i>	GU979049	GU979126
<i>T. himalayense</i>		HKAS25689	会泽, 云南省	未知	AY773356	
<i>T. indicum</i> *	HB2	HKAS96779	遵化, 河北省	<i>Castanea mollissima</i>	MF185133	MF185136
<i>T. indicum</i> *	HB3	HKAS96780	遵化, 河北省	<i>C. mollissima</i>	MF185134	MF185137
<i>T. indicum</i> *	HB4	HKAS96781	遵化, 河北省	<i>C. mollissima</i>	MF185135	MF185138
<i>T. indicum</i> *	T83	HKAS49751	楚雄, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>		GU979129
<i>T. indicum</i> *	T82	HKAS49748	楚雄, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979060	
<i>T. indicum</i> *	T60	HKAS45385	楚雄, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979059	GU979134
<i>T. indicum</i> *	T90	HKAS49752	楚雄, 云南省	<i>P. armandii</i>	Gu979079	GU979135
<i>T. indicum</i> *			楚雄, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>		GU979132
<i>T. indicum</i> *	T25	HKAS44333	贡山, 云南省	<i>C. mollissima</i>	GU979058	GU979114
<i>T. indicum</i> *	T52	HKAS44329	贡山, 云南省	<i>C. mollissima</i>	GU979053	GU979116
<i>T. indicum</i> *	T51	HKAS44330	贡山, 云南省	<i>C. mollissima</i>	GU979052	GU979115
<i>T. indicum</i> *	T75	HKAS44336	贡山, 云南省	<i>C. mollissima</i>	GU979054	
<i>T. indicum</i> *		HKAS44331	贡山, 云南省	<i>C. mollissima</i>		GU979131
<i>T. indicum</i> *	T15	HKAS48273	昆明, 云南省	未知	GU979068	
<i>T. indicum</i> *	T77	HKAS49743	昆明, 云南省	未知	GU979057	
<i>T. indicum</i> *	T49	HKAS44339	昆明, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979078	GU979119
<i>T. indicum</i> *	T26	HKAS44999	昆明, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979066	GU979120
<i>T. indicum</i> *	T72	HKAS44990	昆明, 云南省	未知	GU979065	
<i>T. indicum</i> *	T36		昆明, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>		GU979130
<i>T. indicum</i> *	T74	HKAS47612	永胜, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979056	
<i>T. indicum</i> *	T59	HKAS44987	永胜, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979074	
<i>T. indicum</i> *	T37	HKAS44988	永胜, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979073	
<i>T. indicum</i> *	T46	HKAS47608	永胜, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979055	GU979125

续表1

物种学名	样品编号	凭证标本号	采集地	宿主树种学名	GenBank Accession (ITS)	GenBank Accession (LSU)
<i>T. indicum</i> *	T45	HKAS45382	永胜, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979075	GU979121
<i>T. indicum</i> *	T47	HKAS47606	晋宁, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979070	
<i>T. indicum</i> *		HKAS47607	晋宁, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>		GU979133
<i>T. indicum</i> *	T81	HKAS49746	易门, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979067	GU979127
<i>T. indicum</i> *	T92	HKAS52028	易门, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>		GU979136
<i>T. indicum</i> *	T43	HKAS42398	东川, 云南省	未知	GU979076	GU979123
<i>T. indicum</i> *	T39	HKAS39503	会泽, 云南省	未知	GU979064	GU979118
<i>T. indicum</i> *	T38	HKAS47614	会泽, 云南省	未知	GU979077	GU979124
<i>T. indicum</i> *	T16	HKAS41312	海马哨, 云南省	未知	GU979069	GU979122
<i>T. indicum</i> *	T10	HKAS30261	攀枝花, 四川省	未知	GU979050	GU979112
<i>T. indicum</i> *	T66	HKAS30262	攀枝花, 四川省	未知	GU979051	GU979113
<i>T. indicum</i>			攀枝花, 四川省	未知	DQ329366	
<i>T. indicum</i> *	T113	HKAS44334	会东, 四川省	<i>P. armandii</i>		GU979137
<i>T. indicum</i>	Ti20		未知	未知	U89362	
<i>T. sinense</i>			会东, 四川省	未知	DQ329376	
<i>T. sinense</i> *	T50	HKAS44327	会东, 四川省	<i>P. armandii</i>	GU979063	
<i>T. sinense</i> *	T68	IFS89925	会东, 四川省	<i>P. armandii</i>	GU979062	
<i>T. sinense</i> *	T11	HKAS44319	会东, 四川省	<i>P. armandii</i>	GU979061	GU979117
<i>T. sinense</i> *	T48	HKAS44342	会东, 四川省	<i>P. armandii</i>	GU979071	
<i>T. melanosporum</i>	Tm13		法国	未知	AF132501	
<i>T. melanosporum</i>	A59		法国	未知	AF106878	
<i>T. melanosporum</i>			法国	未知	AJ583651	
<i>T. melanosporum</i>			意大利	未知	U89359	
<i>T. melanosporum</i>			法国			GU979139
<i>T. melanosporum</i>			法国			AF435821
<i>T. pseudoexcavatum</i> *	T31	HKAS47617	保山, 云南省	<i>P. armandii</i>		GU979106
<i>T. pseudoexcavatum</i> *	T114	HKAS52001	会东, 四川省	<i>P. armandii</i>	GU979042	GU979109
<i>T. pseudoexcavatum</i> *	T80	HKAS49747	易门, 云南省	<i>P. yunnanensis</i>	GU979046	GU979107
<i>T. pseudoexcavatum</i> *	T32	HKAS44991	昆明, 云南省	未知	GU979044	
<i>T. pseudoexcavatum</i> *	T18	HKAS4985	昆明, 云南省	未知	GU979043	GU979105
<i>T. sinoaestivum</i> *	T63	HKAS44347	会东, 四川省	<i>P. armandii</i>	GU979038	
<i>T. sinoaestivum</i> *	T3	HKAS44322	会东, 四川省	<i>P. armandii</i>	GQ217542	
<i>Tuber</i> sp.	N123		日本		AB553402	
<i>Tuber</i> sp.	N127		日本		AB553403	

a) *: 本实验自采标本, 黑体表明本文报道的河北地区新采集的标本

脂糖凝胶电泳检测, 序列测定由北京金唯智生物技术有限公司完成. 序列拼接和编辑应用DNASTAR软件包中的Editseq和SeqMan软件(<http://www.dnastar.com/>), 序列排序及系统树的构建采用Mega 6.0软件^[21].

2 结果与分析

2.1 中国“黑块菌”地理分布

前期本课题组基于野外调查、块菌属标本的宏微观形态特征(子囊果表面颜色、光滑或具有瘤突、有无陷窝及子囊孢子的大小、形状和纹饰等)及多基因序列联合分析确定我国“黑块菌”主要包括*T. indicum* complex, *T. sinoaestivum*及*T. pseudoexcavatum*^[20]. *T. indicum* complex是由一类形态上高度相似, 但分子系统学上属明显不同分支的2~4个隐形种组成^[22,23], 包括中国台湾地区的*T. formosum*和最早发现于印度的*T. himalayense*. 依据野外调查、馆藏标本信息以及文献记录, 本课题组发现目前我国报道的60余种块菌, 主要分布在我国西南地区的四川省和云南省. 此外, 在西藏、新疆、山西、辽宁、吉林、湖南、湖北、甘

肃、北京、河北、台湾均有零星分布(图1). 中国“黑块菌”即子囊果表面褐色、具有瘤突, 子囊孢子表面具有刺状纹饰的类群则主要发现于我国西南地区(图2). 本文报道的河北省遵化地区是“黑块菌”除在西南地区之外产量丰富的新增地区. 此外, 子囊果个体较小, 产量较低的“白块菌”类群早期报道发生在我国东北地区^[24], 近年来发现该类群在我国西南地区物种相当丰富. 近5年, 我国学者发表的30余种新块菌, 几乎全为非“黑块菌”, 且2/3的种类采自我国的云南和四川^[15-18]. 这在一定程度上也反映了我国西南地区作为生物多样性热点地区的重要性.

2.1 河北地区“黑块菌”分子系统学分析

基于ITS序列采用最大简约法构建的系统发育树中(图3), 河北的标本(HB2, HB3和HB4)与以往发现的*Tuber indicum* complex中的A组聚在一个大的分支, 其与*T. formosum*、报道自日本的块菌(*Tuber* sp. AB553403和AB553402)均各自形成一个支持率为100%的亚支, 表明它们之间系统关系是既存在着相似性, 又具有相对的独立性. 核糖体大亚基序列分析结果也

图1 块菌属(*Tuber*)种类在我国的地理分布图
黄色圆点代表有块菌分布

图2 中国“黑块菌”种类的地理分布图

图示其主要分布于我国的西南地区,河北地区是“黑块菌”在其主产区外新发现的一个分布区. 红色圆点代表块菌标本采集地

显示河北的块菌落入 *Tuber indicum* complex A组中, 且形成一个较为独立的亚分支, 支持率为81% (图4).

2.2 河北地区“黑块菌”形态学特征

子囊果地下生, 球形、椭圆形或不规则形, 幼时浅紫红褐色, 成熟后逐渐变成紫褐色、黑褐色或黑色, 多数直径1.5~5.0 cm, 偶达12.0 cm以上; 表面具有明显的多角型瘤突, 瘤突基部宽0.1~0.5 cm, 由3~6个角锥构成, 顶端多平钝, 少数瘤突顶端尖. 包被两层, 外层由拟薄壁组织细胞构成, 内层由疏丝组织构成(图5). 产孢组织幼时白色或灰白色, 随成熟度的不同而逐渐变为黄褐色、褐色、黑褐色或黑色, 具有白色、分枝、迷路状分布的菌脉. 子囊球形或椭圆形, 内含1~2 (4)个子囊孢子. 子囊孢子多椭圆形, 少数宽椭圆形; 幼时无色, 随成熟度逐渐变成黄褐色、红褐色、黑褐色或黑色; 大小随子囊内孢子数目不同而有差异, (23~) 24~30 (34)×19~23 (26) μm (1-孢子)(不包括纹饰), 20~28 (30)×(15~) 16~20 (22) μm (2-孢子), (19~) 21~27 (28)×(15~) 17~21 (23) μm (3-孢子), (16~) 18~23 (25)×(13~) 16~18 (20) μm (4-孢子), $Q=(1-)$ 1.15~1.42 (1.45), $Q=1.28\pm0.11$; 孢子表面以离散的刺为主, 部分

孢子表面刺基部加宽连接形成很低的脊, 但刺的顶端是游离的, 刺顶端钝或稍尖, 部分刺顶端有弯钩. 刺通常高5~7 μm , 基部宽1~3 μm .

研究标本. 河北省遵化市, 2016年10月26日, 陈娟450 (HKAS96779)、陈娟451 (HKAS96780), 陈娟452 (HKAS96781).

生境及分布. 中国, 燕山山脉山区丘陵一线的松栎混交次生林和人工种植板栗林下, 北纬40.24°, 东经117.86°.

3 讨论

宏微观形态特征以及分子系统学分析均表明河北地区新采集的块菌标本与目前已报道的 *T. indicum* complex中的块菌极为相似, 尤其与 *T. formosanum*关系密切. 河北地区的块菌标本在系统发育树中聚为一个支持率较高的亚支(BP=100%) (图3), 暗示地理分布区的差异可能对其系统学地位有一定的影响. *T. indicum* complex是一个形态特征变异较大的复杂类群(尤其在子囊孢子的大小, 颜色和表面纹饰等方面), 而河北地区的标本子囊孢子表面具有明显的刺状纹饰且刺顶端游离, 符合该复合群的子囊孢子的典型形态特征.

图3 基于ITS序列,采用最大简约法构建的*Tuber indicum* complex的系统发育树

分支上的数字表示>50%的靴带支持率。黑体编号代表的是河北的标本,系统分析显示河北的标本单独聚类成一个亚分支(BP=100%)。Scale bar=10 nucleotide change

但是,考虑到河北地区的标本与该复合群主要分布区(四川、云南等我国西南地区)的标本相比,地理分布上存在较明显差异,加之该复合群两大分支目前由于缺乏*T. indicum*模式标本的DNA信息而未最终定名,对于嵌合在其中的河北地区的块菌标本,本文暂时将其鉴定为一个*T. indicum* complex新的生态类型(ecotype)。

已有的数据资料显示,块菌资源调查主要集中在我国西南地区,尽管20世纪90年代也曾报道在东北地区有发现*T. indicum* complex种类,但是一直没有新的采集记录。近年来,调查结果显示华北地区的山西省也有丰富的块菌资源,如山西中条山地区已发现太原块菌*T. taiyuanense*、宣化块菌*T. xuanhuaense*和辽东块菌

*T. liaodongense*等6种块菌^[25,26],然而在这一地区发现的多是“白块菌”种类。直到2016年10月人们才在河北遵化地区发现批量“黑块菌”,这更引起了学者对华北地区块菌资源的重视。块菌属贸易种*T. indicum* complex新分布区的发现对全面系统地解析块菌属的起源和演化及对其进行人工种植都有着重要的意义。

中国“黑块菌”(图6)与欧州的*T. melanosporum*、冬块菌(*T. brumale* Vittad.)及夏块菌(*T. aestivum* Vittad.)。在子囊果形态及孢子显微特征方面极为相似,子囊果均具有明显的多角形疣突;子囊孢子表面都具有刺状纹饰或网纹,但孢子的形状及表面刺状纹饰的式样有别:*T. melanosporum*的孢子狭椭圆形,表面具有细小的短刺,刺高2~3 μm;而*T. brumale*的孢子椭圆形,刺密,基部不加宽。*T. aestivum*与我国的中华夏块菌*T. sinoaestivum*形态特征非常相似,区别在于孢子的形状及子囊孢子表面网纹的深度^[8]。

近年来,基于多基因片段联合分析的分子系统学结果显示产自亚洲尤其是中国的*T. indicum* complex在系统树上形成支持率较高的两个分支(*T. indicum* A和B)^[27]。这两大分支包含了以往报道的*T. sinense*, *T. formosanum*。本课题组前期研究依据形态特征和DNA序列特征将*T. sinense*作为*T. indicum*的异名处理^[20],将*T. pseudoexcavatum*作为*T. pseudohimalayense*的异名^[28]并得到广泛认同。而*T. formosanum*是1992年胡弘道依据采自台湾的标本报道的,因为没有指定模式,是一个裸名;随后, Qiao等人^[29]为其指定模式,使之合法化。该种与大陆地区采集的“黑块菌”显著的形态特征区别在于其子囊孢子的特征更相似于*T. himalayense*,即孢子表面的刺基部加宽形成很高的脊,进而形成网纹(图6I和J)。目前普遍认为*T. indicum* complex包括至少两个或两个以上的隐形种或多个不同的生态类型^[27,28]。利用核糖体ITS序列和共显性SSR (simple sequence repeats) 分子标记,开展的谱系地理学和居群遗传学研究表明*T. indicum* complex中存在两个具有显著遗传分化与谱系地理结构的种群(A谱系与B谱系),应当作为两个种来处理^[30]。然而,由于未能获得*T. indicum*和*T. himalayense*模式标本的DNA信息,有关这两大分支的命名一直悬而未决。印度块菌复合群在我国华北地区大量分布,这一分布区的发现,为该类群的群体遗传学研究提供了重要材料,下一步深入分析将会对已有的研究结果进行补充和完善。此外, *T. indicum*全基因组测序的完

图5 河北省遵化地区的块菌标本形态特征(凭证标本KUN-HKAS 96780) (网络版彩图)

A: 成熟的子囊果表面黑褐色, 具有多角形瘤突; B: 包被外层由拟薄壁组织组成; C~F: 示子囊及子囊孢子的形状及孢子表面纹饰, 以游离的刺为主. Scale bar: B=20 μm ; C~F=5 μm

保护区, 建立地方相关的法律法规予以约束掠夺式采集行为, 严禁采集幼嫩块菌子实体. 其次, 科学合理的采集块菌, 适时适度的保护森林生态环境是保护块菌资源持续发展的有力手段. 块菌属成员子囊果于地下发育和成熟, 地上通常没有任何迹象, 因此, 采集非常

困难. 在欧洲, 通常利用成熟母猪(*Sus domesticus*)或训练有素的松露狗协助采集, 而在我国通常是盲目的地毯式的采集. 因此, 建议地方主管部门应规定合理的采收时间(每年11月~次年3月)、采集方法, 各地相关林业管理部门在块菌采收期建立采集培训站, 配置相

图6 中国“黑块菌”子囊果形态特征及电子显微镜下子囊孢子表面纹饰(网络版彩图)

A~I: 中国“黑块菌”子囊果表面颜色及疣突的形态变化. A: KUN-HKAS45383; B: KUN-HKAS52038; C: KUN-HKAS47614; D: KUN-HKAS49743; E: KUN-HKAS44330; F: KUN-HKAS47611; G: KUN-HKAS48273; H: *T. indicum* (K(M) 39493 Holotype); I: *T. himalayense* (K(M)32236 Isotype); J: *T. formosanum* HKAS48268; K: *T. sinoaestivum* KUN-HKAS44347; L: *T. pseudohimalayense* (= *T. pseudoexcavatum*) KUN-HKAS52011. M~T: 扫描电子显微镜下中国“黑块菌”子囊孢子表面特征. M~P: *T. indicum* complex孢子表面以游离的刺为主, 刺高5~7 μm . M: *T. indicum* K (M) 39493, Holotype; N: KUN-HKAS44330; O: KUN-HKAS45382; P: KUN-HKAS52038; Q: *T. melanosporum* KUN-HKAS52034, 示孢子表面短而密的刺; R: *T. himalayense* K (M) 32236 Isotype; 示孢子表面刺基部联合成网纹不规则网纹; S: *T. sinoaestivum* KUN-HKAS44347, 示近球形的孢子表面具有网纹; T: *T. pseudohimalayense* (= *T. pseudoexcavatum*) KUN-HKAS52011, 示孢子表面具有规则的刺-网纹饰. Scale bar=10 μm

关音像资料及相应设施和具备相应专业知识的人员, 凡进入保护区的采集人员有义务接受野生菌生物学及其采集知识的教育与技能的培训, 效仿欧洲等地的凭证采集. 采集时倡导采用母猪或经过训练过的块菌狗来协助采集, 避免与杜绝盲目乱挖乱采.

再次, 地方政府应考虑落实林权制度, 做到保护山林和野生菌资源人人有责; 各级政府适当安排专项资金扶持块菌等珍稀名贵的野生菌研发, 在森林建设项目中, 通过提高森林覆盖率, 同步推广菌根性食药菌的生态种植, 以逐步修复被毁坏的自然森林植被. 最后, 加快我国块菌资源调查力度, 明确我国块菌资源种类多样性、遗传多样性、分布格局及其生态条件, 积极进行菌根化的人工栽培研究, 推进块菌人工种植园的建立.

块菌属成员多与针叶树(松科、杉科)及壳斗科植物共生, 在实验室胁迫的条件下也能与桦木科、杨柳

科杨属、榛科、胡桃科等植物共生形成菌根^[32]. 从生物系统及协同演化先后顺序分析, 与针叶树共生的往往比与阔叶树共生更为古老、原始; 由此, 亚洲中国分布区比欧洲地中海地区可能是更古老的块菌分布演化中心, 同时又兼有近代分化形成的年轻类群. 中国境内广泛分布着以松科和壳斗科为主的针阔混交的林区, 石灰岩成土的区域各地都有. 因此, 我国块菌种类多样性、分布范围及其分布式样要比预想的更为丰富多样. 本文报道的在我国华北地区首次发现大量“黑块菌”的分布, 将自然分布纬度向北推移了近20°, 经度向东也扩展了18°, 大大突破了商业化“黑块菌”只有喜马拉雅山脉及我国西南滇川藏地区的自然地理分布界限, 表明我国大部分石灰岩地区都适合于采用菌根合成技术产业化发展“黑块菌”种植业. 这一新分布区的发现不仅是地理分布及区位的补充和拓展, 更重要的是, 空间的拓展显示出了巨大的生态效

图7 中国“黑块菌”商业采集区现状及市场上出售的未成熟的幼嫩子实体(网络版彩图)

A和B: 中国“黑块菌”自然生长环境(示块菌发生地的植被及生态环境的破坏程度); C和D: 市场上大批出售的不成熟的块菌子囊果(产孢组织白色)

益与产业经济效益的广阔前景。

我国是生物多样性特别丰富的地区, 境内拥有丰富的森林资源, 而以块菌为代表的野生食用菌经济为重要的林下经济, 将成为未来森林农业经济的重要林下产业。其中块菌的种植在石灰岩地区是最具有种植前景的大型真菌之一。块菌属成员属于外生菌根菌, 其生长需要与特定树木共生; 菌根合成主要采取“感

染法”生物技术, 对无菌树苗进行人工接种感染, 然后再将感染好的块菌树苗进行移植造林。一般经过4~5年后林地就可以生产出块菌子实体, 产期最长的可达60~70年。因此, 对于这一类群的研究更重要的工作是有关生态学及其菌根形成机制的研究及人工种植技术的完善, 加快块菌种植园的建立, 为保护和持续利用我国珍贵的地下块菌资源做出努力。

致谢 感谢北京大学国家软实力研究院教授蔡景昆先生, 以及河北省唐山市遵化绿然食用菌合作社孙佳音先生提供考察便利条件及研究材料。

参考文献

- 1 Kirk P M, Cannon P F, Minter D W, et al. Dictionary of the Fungi. 10th ed. Wallingford: CABI, 2008
- 2 Zambonelli A, Lotti M, Murat C. True Truffle (*Tuber* spp.) in the World: Soil Ecology, Systematics and Biochemistry. Berlin: Springer International Publishing AG Switzerland, 2016
- 3 Zhang B C, Minter D W. *Tuber himalayense* sp. nov. with notes on Himalayan truffles. *Trans Brit Mycol Soc*, 1988, 91: 593–597

- 4 Tao K, Liu B, Zhang D C. A new species of the genus *Tuber* from China. *J Shanxi Univ (Nat Sci Ed)*, 1989, 12: 215–218
- 5 Moreno G, Manjón J L, Diez J. *Tuber pseudohimalayense* sp. nov. an Asiatic species commercialized, in Spain similar to the “perigord” truffle. *Mycotaxon*, 1997, 63: 217–224
- 6 Hu H T. *Tuber formosanum* sp. nov. and its mycorrhizal associations. *J Exp Forest, Nat Taiwan Univ*, 1992, 2: 79–82
- 7 Wang Y, Moreno G, Rioussel L J, et al. *Tuber pseudoexcavatum* sp. nov. A new species from China commercialized in Spain, France and Italy with additional comments on Chinese truffles. *Cryptogamie Mycologie*, 1988, 19: 113–120
- 8 Zhang J P, Liu P G, Chen J. *Tuber sinoaestivum* sp. nov., an edible truffle from southwestern China. *Mycotaxon*, 2012, 122: 73–82
- 9 刘长娇, 于回萍, 李玉. 块菌有效成分和活性研究进展. *安徽农业科学*, 2012, 40: 2017–2019
- 10 陈娟. 中国块菌属的分类与系统学. 博士学位论文. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2007
- 11 李淑超, 乔鹏, 刘思思, 等. 块菌属分子系统学及菌根共生机制研究进展. *菌物学报*, 2017, 36: 131–144
- 12 邓晓娟. 印度块菌菌根及其子囊果内微生物多样性研究——兼论中国白块菌新分类群. 博士学位论文. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2012
- 13 乔鹏. 中国西南地区印度块菌复合群谱系地理学及群体遗传学研究, 博士后工作报告. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2013
- 14 刘培贵. 中国的块菌(松露). 北京: 科学出版社, 2016
- 15 Fan L, Zhang P R, Yan X Y, et al. Phylogenetic analyses of Chinese *Tuber* species that resemble *T. borchii* reveal the existence of the new species *T. hubeiense* and *T. wumengense*. *Mycologia*, 2016, 108: 354–362
- 16 Fan L, Han L, Zhang P, et al. Molecular analysis of Chinese truffles resembling *Tuber californicum* in morphology reveals a rich pattern of species diversity with emphasis on four new species. *Mycologia*, 2016, 108: 344–353
- 17 Wan S P, Wang X H, Zheng Y, et al. *Tuber shidianense* and *T. calosporum*, two new truffle species from southwest China. *Mycoscience*, 2016, 57: 393–399
- 18 Wan S P, Tang L, Zheng Y, et al. Two novel *Tuber* species (Tuberaceae, Pezizales) in the *Latisporum* Group from China. *Mycoscience*, 2017, 58: 312–319
- 19 Yang Z L, Zhang L F. Type studies on *Clitocybe macrospora* and *Xerula furfuracea* var. *bispora*. *Mycotaxon*, 2003, 88: 447–454
- 20 Chen J, Guo S X, Liu P G. Species recognition and cryptic species in the *Tuber indicum* complex. *PLoS ONE*, 2011, 6: e14625
- 21 Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 2013, 30: 2725–2729
- 22 李淑超. 交配型基因在印度块菌复合群鉴定及菌根合成中的应用. 硕士学位论文. 北京: 中国医学科学院药用植物研究所, 2017
- 23 Belfiori B, Riccioni C, Paolocci F, et al. Mating type locus of Chinese black truffles reveals heterothallism and the presence of cryptic species within the *T. indicum* species complex. *PLoS ONE*, 2013, 8: e82353
- 24 王云, 刘培贵. 块菌名实考证及其资源保护. *植物分类与资源学报*, 2011, 33: 625–642
- 25 周林, 郭尚, 赵照林, 等. 山西省块菌资源分布及其环境条件分析. *食药菌*, 2016, 24: 86–89
- 26 刘虹, 杨杰, 萧晋川, 等. 山西中条山块菌资源研究. *山西大学学报(自然科学版)*, 2017, 40: 353–357
- 27 Wang Y, Tan Z M, Zhang D C, et al. Phylogenetic and populational study of the *Tuber indicum* complex. *Mycol Res*, 2006, 110: 1034–1045
- 28 Chen J, Liu P G. Delimitation of *Tuber pseudohimalayense* and *T. pseudoexcavatum* based on morphological and molecular data. *Cryptogamie Mycologie*, 2011, 32: 83–93
- 29 Qiao P, Liu P G, Hu H T, et al. Typification of *Tuber formosanum* (Tuberaceae, Pezizales, Ascomycota) from Taiwan, China. *Mycotaxon*, 2013, 123: 293–299
- 30 Feng B, Zhao Q, Xu J, et al. Drainage isolation and climate change-driven population expansion shape the genetic structures of *Tuber indicum* complex in the Hengduan Mountains region. *Sci Rep*, 2016, 6: 21811
- 31 Trappe J M, Claridge A W. The hidden life of truffles. *Sci Am*, 2010, 302: 78–84
- 32 Benucci G M N, Bonito G, Falini L B, et al. Truffles, timber, food, and fuel: sustainable approaches for multi-cropping truffles and economically important plants. In: Zambonelli A, and Bonito G M, eds. *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms, Soil Biology*. Berlin: Springer Heidelberg, 2012

Distribution, biological diversity, and conservation of Chinese black truffle

CHEN Juan¹, LI ShuChao¹, LI JiaMei¹, YAN Bo¹ & LIU PeiGui²

¹ Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

² Key Laboratory for Plant Biodiversity and Biogeography for East Asia, Kunming Institute of Botany,
Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China

Truffles are hypogeous ascomycetes belonging to the genus *Tuber*, which produces edible ascocarps of high market value. *Tuber indicum* complex (Chinese black truffle) is mainly distributed in the southwestern region of China (Yunnan and Sichuan). It is the largest and most widely distributed wild trade edible species of the genus *Tuber* in China. In our previous field investigation on *Tuber* resources, we found some “black truffle” under artificial cultivation in a chestnut forest in Zunhua area of Hebei province, North China. Morphological and molecular phylogenetic analysis revealed that the “black truffle” was closely related to the *T. formosanum* and the *T. indicum*. Combining its geographical distribution and host tree information, we recognized it as an ecotype of the *T. indicum* complex. These findings provide important information for understanding the origin and evolution of the global *Tuber* genus and cultivation of Chinese black truffle. In addition, this study also reveals the taxonomy and distribution status of wild resources of the Chinese black truffle, and proposes some suggestions for the protection and sustainable utilization of truffles in the future.

***Tuber indicum* complex, *T. sinoaestivum*, Hebei region, ecotype**

doi: [10.1360/N052017-00043](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052017-00043)