

调查研究

基于子实体形态特征及 rDNA-ITS 序列分析对黔东南州枞树菌的分类鉴定

吴安忠,韦小宝,曾怡,刘英,杨蕊,黄俊飞
(贵州省疾病预防控制中心,贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 为明确贵州省黔东南苗族侗族自治州(简称黔东南州)枞树菌野生菌分类地位,提供食源性野生毒蕈中毒事件中野生菌的鉴定方法依据。方法 根据枞树菌子实体特征进行形态学鉴定,基于子实体核糖体 DNA 内转录间隔区(rDNA-ITS)基因序列,采用邻接法(NJ)进行系统发育关系分析。结果 黔东南主要贸易乳菇属类的枞树菌有3种,根据子实体形态特征将靛蓝色、紫红色、橙黄色样本分别鉴定为靛蓝乳菇亚种(*Lactarius subindigo*)、红汁乳菇(*Lactarius hatsudake*)和鲜艳乳菇(*Lactarius vividus*)。从 GENBANK 下载 31 个菌株与 3 个代表样本 ITS 基因序列构建的系统发育树分为两大分支,枞树菌与其他近缘红菇属有毒菌类明显区分;代表样本 TL1 与靛蓝乳菇亚种、TZ1 与红汁乳菇、TH1 与鲜艳乳菇分别聚为一簇,与形态学鉴定结果一致。结论 黔东南地区枞树菌主要贸易种为红汁乳菇和鲜艳乳菇,与贵阳地区的紫花菌属同物异名,其中靛蓝乳菇亚种属贵州省首次报道。
关键词:乳菇属;鲜艳乳菇;靛蓝乳菇亚种;红汁乳菇;分类鉴定
中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)04-0435-05
DOI:10.13590/j.cjfh.2021.04.006

Classification and identification of *Lactarius* based on morphological characteristics of fruiting bodies and rDNA-ITS sequence analysis in Qiandongnan

WU Anzhong, WEI Xiaobao, ZENG Yi, LIU Ying, YANG Rui, HUANG Junfei
(Guizhou Center for Disease Control and Prevention, Guizhou Guiyang 550004, China)

Abstract: **Objective** In order to clarify the taxonomic status of *Lactarius* in Qiandongnan of Guizhou, and provid the basis for the identification of wild fungi in foodborne wild mushroom poisoning. **Methods** The morphological characteristics of fruiting bodies and phylogenetic analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer (rDNA-ITS) gene sequences were used for identification. **Results** It was clear that there were 3 main kinds of *Lactarius* in the markets. The samples of indigo, amaranth and aurantius were identified as *Lactarius vividus*, *Lactarius hatsudake* and *Lactarius subindigo* based on morphological features. Then ITS gene sequence phylogenetic trees for the 34 fungi strains were divided into two branches, the *Lactarius* and other toxic fungi of the affinis species were distinguished. The TL1 and *Lactarius subindig*, TZ1 and *Lactarius hatsudake*, TH1 and *Lactarius vividus* were clustered into one group respectively, which were consistent with morphological identification results. **Conclusion** The main species of *Lactarius* in Qiandongnan were the *Lactarius hatsudake* and *Lactarius vividus*, which were the same as another *Lactarius* in Guiyang. Among the *Lactarius* species, TL1 was identified as *Lactarius subindigo*, this was the first case reported in Guizhou.
Key words: *Lactarius*; *Lactarius vividus*; *Lactarius subindigo*; *Lactarius hatsudake*; classification and identification

枞树菌是一类在松树林与落叶阔叶林混交林中的灌木丛下生长的乳菇属(*Lactarius*,以下简称*L.*)野生菌类的统称,主要为贵州省黔东南苗族侗族自治州(简称黔东南州)地区贸易用名,与云南地

区将红汁乳菇(*L. hatsudake*)、松乳菇(*L. deliciosus*)及粗质乳菇(*L. terrimus*)等乳菇属菌类称为铜绿菌、谷熟菌的意义相近。乳菇属真菌属于担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、红菇科(*Russulaceae*),是一类食用、药用价值较高的菌类,大多数均是外生菌根真菌,我国出版专著收录有21种^[1],顾新伟等^[2]调查总结了浙南山区乳菇属菌类有24种,薛振文等^[3]新增报道橙色乳菇(*L. akahatsu*)和鲑色乳菇(*L. salmonicolor*)2种,目前国内报道约有40多种为可食用乳菇。乳菇属中多以美味乳菇组真菌(*L. sect. Deliciosi*)为主,主要包括红汁乳菇、松乳

收稿日期:2020-11-30
基金项目:贵州省疾病预防控制中心青年技术基金(2020-E1-8青);
贵州省科技计划(黔科合平台人才[2018]5767)
作者简介:吴安忠 男 农艺师 研究方向为野生菌分类鉴定及开发利用 E-mail: wuanzhongGZCDC@163.com
通信作者:黄俊飞 男 主管技师 研究方向为病原微生物检测
E-mail: 15285112871@163.com

菇、鲜艳乳菇 (*L. vividus*), 多产于云南、贵州、四川等地, 王向华^[4]对云南省农贸市场贸易量较大的乳菇进行统计鉴定, 明确云南地区食用流通量的乳菇属有 13 个种, 贸易量最大的为红汁乳菇、松乳菇、稀褶乳菇 (*L. hygrophoroides*) 和多汁乳菇 (*L. volemus*)。

每年夏秋季为乳菇菌贸易量较大的季节, 也是误采误食野生毒蕈中毒公共卫生事件多发的季节, 2004—2013 年贵州省共报告毒蕈中毒事件 118 起, 中毒 698 人, 死亡 85 人, 病死率为 12.18%^[5]。在病例回顾分析中, 患者食用野生菌中毒主要是由于所认知的可食用野生菌类混杂有毒菌类误食所引起的^[6], 但在对野生毒蕈中毒事件的毒物溯源方面常出现野生菌形态学不完整的现象, 对毒物准确鉴定难度较大, 均是靠患者病情恢复后回忆和样本复采后鉴定^[7]。目前有部分野生菌不可培养或人工获得纯培养难度大、周期长, 采用获得疑似野生菌纯培养菌株再进行鉴定的常规处置方式会降低事件报告效率, 而选择可靠的分子生物学鉴定手段对形态特征不完整和不可培养的食用野生菌(或野生毒蕈)作出准确的甄别是必要的。

核糖体 DNA 内转录间隔区 (ribosomal DNA internal transcribed spacer, rDNA-ITS) 基因是目前真菌属内种间鉴定可靠的基因片段, 在食用野生菌和野生毒蕈的鉴定上有研究报道, 特别是对野生菌子实体直接进行分子鉴定亦有研究基础^[8-12]。为明确黔东南州贸易量较大的食用乳菇属种类, 以便在应对食源性野生毒蕈中毒的公共卫生事件中快速有效排除已知菌类对毒蕈鉴定结果的干扰和提供可靠的野生菌鉴定方法依据, 本研究通过调查黔东南州凯里市野生菌销售市场, 对施秉县、黄平县以及凯里市旁海镇等地农户采集至凯里农贸市场销售的枞树菌进行初步分类, 其中贸易量较大的主要为紫红色和橙黄色子实体的乳菇属 2 个种, 本研究也发现 1 种靛蓝色子实体的枞树菌, 但贸易量较少。为保证采集样本的地理准确, 以施秉县为野外样本采摘点, 采集的枞树菌样本进行子实体形态特征描述并结合分子生物学进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

样本采摘于黔东南州施秉县杨柳塘镇板屯村附近山上 (北纬 26.35 度, 东经 106.41 度, 海拔约 1 100 m) 的马尾松林下的灌木丛中。采集 3 类枞树菌的靛蓝色样本 38 株、橙黄色样本 135 株和紫红色样本 143 株, 依据子实体形态特征对样本进行种类

鉴定, 并选取典型样本带回实验室进一步分子生物学鉴定。

1.2 方法

1.2.1 形态学鉴定

样本采集时记录采集区域和生长环境, 拍摄子实体形态特征, 参考《中国大型真菌原色图鉴》^[1]和《云南省乳菇属贸易种的分组及分种检索表》^[4]等工具书进行形态学甄别。

1.2.2 子实体 DNA 提取

DNA 提取方法参考李河等^[10]的方法并略作改进, 具体为: 将鲜子实体样本擦净污渍, 用无菌刀片切取约 0.5 cm³ 大小子实体 3~5 块, 用无菌石英砂或液氮充分研磨, 移入 1.5 mL 离心管, 使用真菌提取试剂盒 [Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司] 进行提取, 获得子实体样本 DNA 保存于 -20 ℃ 冰箱中用于下一步实验。剩余子实体样本用食品烘干机 41 ℃ ~ 45 ℃ 烘干后冷冻保存。

1.2.3 rDNA-ITS 扩增

扩增核糖体 DNA 的 ITS 基因片段的 ITS1、5.8S、ITS2 区域所用引物为真菌通用引物 ITS5/ITS4^[13], 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列为 ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGT CGTAACAAGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3'。聚合酶链式反应 (PCR) 反应体系 (50 μL): 25 μL Mix-Taq 酶、各 2 μL (10 μmol/L) 上下游引物、2 μL DNA、19 μL ddH₂O。扩增程序参考文献^[14]: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物检测及测序

扩增 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶 (制胶时加入核酸染色剂) 电泳, 并在凝胶成像系统下检查扩增结果并拍照; 将扩增 ITS 区的阳性 PCR 产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化、克隆和测序, 测序结果用 DNAMAN Version 9.0 进行拼接和手动校对, 获得 DNA 序列用于系统发育树的构建。

1.2.5 系统发育分析

样本核苷酸基因序列在 GENBANK 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 进行 Blast 比对, 并下载同源性高且已知种名的菌株基因序列, 用软件 MEGA5.22 对下载序列进行 Muscle (Codons) 方法^[15]的多重序列比对, 对结果进行遗传距离的计算。采用邻接法 (NJ)^[16]构建系统发育树, 自举法 (Bootstrap) 检验 1 000 次。样本经形态

学和分子生物学方法鉴定明确后,将样本 ITS 基因序列上传至 GENBANK 数据库并获得登录号。

2 结果与分析

2.1 枞树菌形态学鉴定

根据采集到的样本子实体菌盖、菌柄、菌褶的颜色、初始乳汁和伤后变色情况等形态特征,对靛蓝色、紫红色、橙黄色 3 类样本初步鉴定为 3 个种,具体描述如下(见图 1A)。

靛蓝色样本:菌盖颜色为浅靛蓝色,菌盖表面具有明显同心环纹,具凹陷的中心;菌缘幼时弯曲,成熟时平展;菌褶稍密,瘀伤后呈深蓝绿色;菌柄中空蓬松,圆柱状或向基部逐渐变细,子实体脆易碎;初始乳汁浅蓝色;由于乳汁与子实体颜色趋于浅色与深色的靛蓝乳菇(*L. indigo*)是区分较为明显,因此将该类样本初鉴定为靛蓝乳菇亚种(*L. subindigo*)(见图 1B)。

紫红色样本:菌盖颜色葡萄酒紫红色,表面具有不甚明显的同心环纹,中央凹陷,湿时表面稍粘;菌柄中空,不具红色窝斑,下端稍歪;菌肉白色,具有紫红色小点;菌褶狭窄,稍密;乳汁初始为血红色;子实体伤变深青;初鉴定为红汁乳菇(*L. hatsudake*)(见图 1C)。该种与血红乳菇(*L. sanguifluus*)的形态较为相似,但红汁乳菇菌柄上无红色窝斑,伤后变深蓝绿色或铜绿色,可与血红乳菇区别^[4]。

橙黄色样本:菌盖和菌柄浅黄色或橙黄色,局部有暗绿色;菌盖厚,擦伤不变色或老时淡绿色,表面微带环纹,仅 1/2~2/5 处有明显或微弱的同心环纹;菌褶厚,初生近丛生,随着年龄的增长而疏远,浅橙色至金黄色,伤不变色或变暗绿色;菌柄等长或稍向下渐狭与 WANG 等^[17]报道的鲜艳乳菇(*L. vividus*)极为相似,初定该类样本为鲜艳乳菇(见图 1D)。该种与松乳菇(*L. deliciosus*)和鲑色乳菇(*L. salmonicolor*)子实体形态均为橙色至金黄色,乳汁不变色等特点,在形态上较为相近。基于子实体形态上的高度相似性,尽管作了初步鉴定,但仍需进行分子水平上的鉴定。

2.2 枞树菌的 rDNA-ITS 序列扩增结果

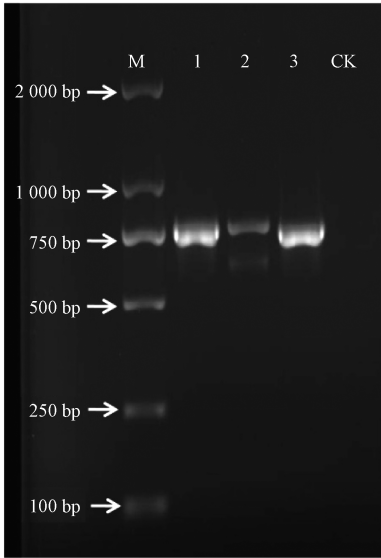
分别选取枞树菌靛蓝色、紫红色和橙黄色代表样本并编号为 TL1、TZ1、TH1。并对其子实体进行 rDNA-ITS 基因扩增,扩增结果条带清晰,特异性好,条带片段约为 750 bp,设置的空白对照无条带(见图 2)。阳性产物测序结果经拼接和手动校对,获得长度分别为 693 bp(TL1)、676 bp(TZ1)和 670 bp(TH1)长度的 ITS 基因序列。



注:A 为 3 类样本子实体;B 为靛蓝色子实体样本;
C 为紫红色子实体样本;D 为橙黄色子实体样本。

图 1 枞树菌子实体形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of fruiting bodies



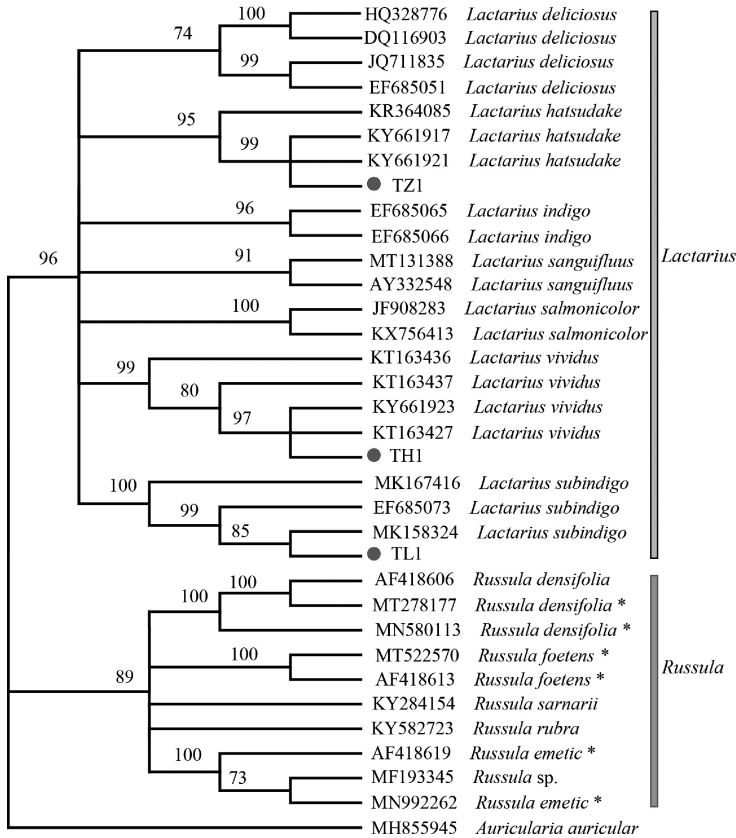
注:M;DNA-Marker2000;泳道 1~3 分别为样本 TH1、
TL1、TZ1;CK 为空白对照。

图 2 3 个枞树菌 rDNA-ITS 扩增凝胶电泳图

Figure 2 The electrophoresis analysis of rDNA-ITS sequences
from 3 species of *Lactarius* via PCR

2.3 枞树菌的系统发育分析

3 个枞树菌样本 TL1、TH1、TZ1 的 ITS 序列与从 GENBANK 中下载的红菇科乳菇属 7 个种共 20 个菌株和红菇属(*Russula*)5 个种共 10 个菌株的 ITS 序列以及以黑木耳[*Auricularia auricula*(*L.*:Hook.) Underw.]作为外群的 34 个基因序列经多重序列比对后,序列平均遗传距离分析结果为 0.15。自举法一致树(Bootstrapconsensus tree)结果表明(图 3),33 个红菇科基因序列明显划分为乳菇属和红菇属 2 大分支,枞树菌样本及其他食用乳菇属菌株与近缘红菇属有毒红菇及其他菌株属间有明显区分。同一属内同种菌株聚为一支,未出现种间交叉聚类的情况。亚种水平的靛蓝乳菇(*L. indigo*)与靛蓝乳菇亚种(*L. subindigo*)不聚为一类。说明用 ITS 基因序列进行的系统发育分析结果在种及以上水平具



注：● 标记为样本；* 标记为报道有毒菇菌；分支节点上的数值为自举值（仅显示>70%）

图 3 基于 ITS 基因序列构建的 NJ 树

Figure 3 Neighbor joining tree based on ITS gene sequence

有明显的区分能力。

乳菇属进化分支中,样本 TZ1 与红汁乳菇 (*L. hatsudake*)、TH1 与鲜艳乳菇 (*L. vividus*)、TL1 与靛蓝乳菇亚种 (*L. subindigo*) 聚为一类,与其他种的松乳菇 (*L. deliciosus*)、靛蓝乳菇 (*L. indigo*)、血红乳菇 (*L. sanguifluus*) 和鲑色乳菇 (*L. salmonicolor*) 明显区分,系统进化分析结果支持 TZ1、TH1、TL1 分别鉴定为红汁乳菇、鲜艳乳菇和靛蓝乳菇亚种,与子实体形态学鉴定结果一致。

结合形态学和分子生物学鉴定结果,将来自贵州省施秉县的样本 TZ1、TH1、TL1 分别定名为红汁乳菇、鲜艳乳菇和靛蓝乳菇亚种,并将 ITS 基因序列上传至 GENBANK 数据库,获得登录号分别为: MW255368、MW255369、MW255367。

3 讨论

乳菇属种类繁多,食用价值高,但不乏有食用后引起中毒的种类^[18],例如绒白乳菇 [*Lactarius vellereus* (Fr.) Fr.] 记载是有毒的^[19],但在市场上有与其他乳菇混合出售的情况^[4]。夏秋季为野生菌生长旺季,野生毒蕈易误采,常出现掺杂于贸易量较大的食用野生菌中误食,做好食用野生菌的分类鉴定,提高野生菌分子生物学检测能力,在预防与

处置野生毒蕈中毒事件中具有重要意义。在既往的鉴定方法研究中,林峰等^[8]在处置毒蘑菇中毒事件中通过分子生物学手段扩增残余的食用后菌类子实体 rDNA-ITS 并作系统进化分析,将引起中毒的毒蘑菇鉴定为亚稀褶黑菇 (*Russula subnigricans* Hongo);朱姝等^[6]通过形态学、分子生物学及毒素检测的手段对一起误食毒蘑菇事件的毒菌鉴定为淡红鹅膏菌。本研究对黔东南州市场贸易量较大的枞树菌进行形态学和基于 rDNA-ITS 基因的分子生物学鉴定,明确了枞树菌的分类地位,补充了在食用野生菌方面的鉴定方法,为今后在实际毒蘑菇中毒事件中提供一种有效的野生菌鉴定参考。

从系统发育分析结果看,可食用的松乳菇、鲑色乳菇以及鲜艳乳菇、靛蓝乳菇亚种和红汁乳菇都与近缘红菇属内有毒的密褶黑菇 (*Russula densifolia*)、毒红菇 (*Russula emetic*)、臭黄(红)菇 (*Russula foetens*) 种间区分明显,表明 rDNA-ITS 基因用于野生毒蕈与食用野生菌的鉴别在种及以上水平的鉴定结果是可靠的。本研究将黔东南地区枞树菌 TH1 与 TZ1 鉴定为鲜艳乳菇、红汁乳菇,结果与董芳等^[20]报道的贵阳地区紫花菌乳菇属种类鉴定结果一致,表明枞树菌与紫花菌属于同物异名,为不同地区的贸易用名。靛蓝色乳菇亚种在我国

鲜见报道,国内外多以靛蓝乳菇记载为主,主要集中在研究靛蓝乳菇与松属、栎属植物共生关系上^[21-22],可能是该种的子实体为靛蓝色与乳菇属其他种较好区别,在分类学上的报道较少;本研究中,样本 TL1 被鉴定为靛蓝乳菇亚种,其形态学特征与印度 DAS^[23]报道的一致,该种在贵州省属首次报道,我国其他省份及省内其他地区的分布情况需进一步的确定,以便更好地开发和利用。

志谢:闫文凯(福建农林大学),张丽、周亚娟(贵州省疾病预防控制中心)。

参考文献

[1] 黄年来. 中国大型真菌原色图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社,1998;1-289.

[2] 顾新伟,何伯伟,应国华,等. 浙南山区红菇资源调查[J]. 浙江林业科技,2012,32(3):55-57.

[3] 薛振文,梁俊峰,应国华,等. 红汁乳菇及近缘种的分子鉴定及遗传距离分析[J]. 中国食用菌,2013,32(6):36-37.

[4] 王向华. 云南乳菇属贸易种的分类学研究[J]. 云南植物研究, 2000,22(4):419-427.

[5] 王娅芳,周亚娟,朱姝,等. 2004—2013 年贵州省毒蕈中毒事件流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志,2015,27(1):49-53.

[6] 朱姝,陈作红,周平,等. 一起因食用淡红鹅膏菌引起的中毒事件报告[J]. 预防医学,2016,28(7):719-720.

[7] 何洁仪,马林. 广州市四起毒蘑菇中毒的调查与防治对策[J]. 中国食品卫生杂志,2001,13(5):29-31.

[8] 林锋,庄东铭,黄信有,等. 应用 rDNA-内转录间隔区分子条形码技术调查福建省亚稀褶黑菇中毒事件[J]. 中国食品卫生杂志,2019,31(3):276-280.

[9] JABEENABEEN S,KIRAN M,KHAN J,et al. Amanitaahmadii, a new species of Amanita subgenus Amanitina section Validae from Pakistan[J]. MycoKeys, 2019,56:81-99.

[10] 李河,周国英,刘君昂. 红汁乳菇、半血红乳菇及橙色乳菇的 rDNA-ITS 序列分析[J]. 河南农业科学, 2007, 36(11):

88-90.

[11] 陈玉华,刘君昂,周国英,等. 松乳菇 ITS 序列比较及其在乳菇属中的系统发育分析[J]. 食用菌学报,2013,20(1):18-24.

[12] 蔡箴,唐丽萍,杨祝良. 大型经济真菌的 DNA 条形码研究——以我国剧毒鹅膏为例[J]. 植物分类与资源学报, 2012,34(6):614-622.

[13] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[J]. PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier,1990;315-322.

[14] 吴安忠,程崖芝,巫升鑫,等. 烟草镰刀菌根腐病的病原鉴定[J]. 中国烟草学报,2018,24(2):135-140.

[15] EDGAR R C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity [J]. BMC Bioinformatics,2004,5(1):1-19.

[16] TAMURA K, NEI M, KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method [J]. PNAS,2004,101(30):11030-11035.

[17] WANG X H, NUYTINCK J, VERBEKEN A, et al. *Lactarius vividus* sp. nov. (Russulaceae, Russulales), a widely distributed edible mushroom in central and southern China[J]. Phytotaxa, 231(1):63.

[18] 图力古尔,包海鹰,李玉. 中国毒蘑菇名录[J]. 菌物学报, 2014,33(3):517-548.

[19] 应建浙,赵继鼎,卯晓岚. 食用蘑菇[M]. 北京:科学出版社, 1982;46.

[20] 董芳,张传博,吴石平. 基于 ITS 及 GPD 序列分析对贵州紫花菌的分类鉴定[J]. 热带作物学报, 2018, 39(9):1794-1799.

[21] FLORES R, DÍAZ G, HONRUBIA M. Honrubia. Mycorrhizal synthesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. with five Neotropical pine species[J]. Mycorrhiza,2005,15(8):563-570.

[22] NUYTINCK J, VERBEKEN A, MILLER S L. Worldwide phylogeny of *Lactarius* section *Deliciosi* inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences[J]. Mycologia,2007,99(6):883-832.

[23] DAS K. New and interesting species of *Lactarius* from India[J]. Mycotaxon,2003,88:377-385.

· 专家寄语 ·

以安全为基础,以健康为目标,《中国食品卫生杂志》成为各级政府制定政策、企业研发及国民食物消费的科学信息交流平台。

——张永慧(编委会副主任委员,广东省疾病预防控制中心首席科学家)