

田慧敏,文 静,任 芳. 色钉菇(*Chroogomphus rutilus*)形态学和 ITS 测序鉴定[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):261-263.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.075

# 色钉菇(*Chroogomphus rutilus*)形态学和 ITS 测序鉴定

田慧敏,文 静,任 芳

(赤峰学院生命科学学院,内蒙古赤峰 024000)

**摘要:**利用子实体形态特征和 rDNA-ITS 测序分析相结合的方法,对采自内蒙古赤峰市赛罕乌拉自然保护区的 1 份色钉菇[*Chroogomphus rutilus* (Schaeff.) O. K. Mill.]进行了鉴定,对其 rDNA-ITS 区段进行扩增,片段约为 730 bp,并对其外形特征及显微特征进行了详细描述。

**关键词:**色钉菇;ITS 测序;形态学;菌种鉴定

**中图分类号:**S646.901 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)05-0261-03

色钉菇[*Chroogomphus rutilus* (Schaeff.) O. K. Mill.],别称血红铆钉菇,俗称红蘑、松蘑等,属担子菌门牛肝菌目(Boletales)铆钉菇科(Gomphidiaceae)色钉菇属(*Chroogomphus*),首次由 Jacob 于 1774 年描述为 *Agaricus rutilus*,后 Miller 于 1964 年划入色钉菇属 *Chroogomphus*<sup>[1]</sup>。该菌与松属的植物共生,最早发现于欧洲和北美,主要识别特点是菌盖近圆锥形,后平展中部凸起,边缘内卷,浅紫褐色至咖啡褐色、砖红色、红褐色,湿时黏,干有光泽。菌褶延生,稀,青黄色渐变紫褐色,不等长,菌柄与菌盖色相近且基部带黄色,上部有易消失的红褐色菌环,囊状体呈长棒状<sup>[2]</sup>。

研究表明,色钉菇含有多种氨基酸、蛋白质、维生素、多糖、萜类、内酯、香豆素、酚类、甾类等营养物质,具有广泛的药用活性<sup>[3]</sup>,其多糖具有明显的抗肿瘤活性,尤其对肝癌的治疗具有辅助作用<sup>[4-7]</sup>,在我国该菌广泛分布,是名贵的野生食用真菌和药用菌,深受人们的喜爱,但是其子实体受环境和地域的影响,颜色、大小会有一定的变化,而且该种与多种铆钉菇科真菌外形相似,如粘铆钉菇(*Gomphidius glutinosus*)、红铆钉菇(*G. roseus*)、亚红铆钉菇(*G. subroseus*)等,采食时容易混淆,市场上的干品经常会混有其他品种,因此仅靠形态识别会产生误差。国内外许多菌物学家利用 ITS 测序技术对其进行了鉴定并研究了演化地位<sup>[8-10]</sup>。本研究利用形态学和 rDNA-ITS 序列测序法相结合的方法对色钉菇(*Chroogomphus rutilus*)进行了分类鉴定并做了详细的描述。

收稿日期:2015-03-31

基金项目:内蒙古高等学校科学研究项目(编号:NJZZ16248)。

作者简介:田慧敏(1980—),女,内蒙古呼和浩特人,硕士,讲师,从事真菌学研究。E-mail:tiancfxy2009@126.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试标本

供试标本子实体于 2013 年 8 月 17 日采自内蒙古赤峰市赛罕乌拉自然保护区庆云山(43°12'~44°28'N,118°11'~120°05'E),樟子松地上散生。标本晾干后,编号(CFSZ10397、10390)、分类、鉴定,超低温冷冻后存放于赤峰学院菌物标本室(CFSZ)。

### 1.2 形态鉴定

宏观观察使用体视显微镜,颜色的判断主要依据采集时拍摄的彩色照片,大小用游标卡尺测量新鲜子实体 2~5 个,菌盖、菌柄大小、颜色、形状、附属物等,菌褶颜色,变化,着生方式,菌肉颜色、味道、气味等项。显微观察通常 4%~5% KOH 作浮载剂。孢子、菌丝、囊状体、担子等的淀粉质反应是将材料置于 Melzer 氏试剂中来判断。

### 1.3 ITS 鉴定

**1.3.1 基因组 DNA 的提取及检测** 子实体干品菌盖部分(含菌褶)用液氮研磨,使用北京鼎国生物公司的真菌 DNA 提取试剂盒对提取的 DNA 进行纯化后,先用 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.3.2 rDNA-ITS 区 PCR 扩增** ITS-PCR 的扩增体系为:PCR mix 25  $\mu$ L, 20 mol/L ITS1/ITS4 引物各 0.5  $\mu$ L,模板 DNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L,反应总体积为 50  $\mu$ L。扩增反应在德国 eppendorf 公司的 5331 型 PCR 扩增仪上进行。扩增程序为:94  $^{\circ}$ C 3 min;95  $^{\circ}$ C 40 s,58  $^{\circ}$ C 40 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,共 34 个循环;72  $^{\circ}$ C 5 min;4  $^{\circ}$ C 保存。ITS 引物为 ITS1 和 ITS4 通用引物<sup>[11]</sup>。

**1.3.3 测序** PCR 产物经 Takara 胶回收试剂盒回收纯化

[10] Li Y Q, Chen F, Linskens H F. Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants[J]. Sexual Plant Reproduction, 1994, 7(3): 145-152.

[11] 杨晓东, 孙素琴, 李一勤. 硼缺乏导致花粉管细胞壁多糖分布的改变[J]. 植物学报, 1999, 41(11): 1169.

[12] Leduc N, Monnier M, Douglas G C. Germination of trinucleated pollen: formulation of a new medium for *Capsella bursa-pastoris*[J]. Sexual Plant Reproduction, 1990, 3(4): 228-235.

[13] 赵宏波, 陈发棣, 房伟民. 栽培小菊和几种菊属植物花粉萌发研究[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 22-27.

[14] Jackson J F. Borate control of energy driven protein secretion from pollen and interaction of borate with auxin or herbicide a possible role for boron in membrane events[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1991, 10: 221-229.

[15] 符 碧. 尿素和硼及生长调节剂对荔枝花粉萌发与生长的影响[J]. 云南师范大学学报:自然科学版, 2001, 21(3): 62-65.

后,委托上海生工生物科技有限公司完成。

1.3.4 ITS 序列比较和系统发育分析 将已测得的 ITS 序列和从 GenBank 上获得的相似度 90% 以上的铆钉菇属和粘铆钉菇属 18 个 ITS 序列,用 MEGA 6.06 软件进行多重对比排比,并采用最大相似法(ML)构建系统发育树,系统树的每个分支的统计学显著性分析以 Bootstrap 方法进行检验,重复次数为 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定结果

根据样品 10397 子实体菌盖的颜色、形状、大小以及孢子、担子、囊状体等显微形态特征初步鉴定为色钉菇 [*Chroogomphus rutilus* (Schaeff.) O. K. Mill.]。

子实体中等大小,菌盖直径 2.5~9.0 cm,初期钟形或近圆锥形,后平展中部凸起,边缘内卷,有时平展,紫红色、葡萄酒红色、砖红色,表面很黏,光滑,表皮下淡紫红色;菌肉白色带红色,干后淡紫红色,近菌柄基部带黄色,无明显气味,菌褶延生,稀,幼时青黄色、锈色,后渐变为紫褐色、灰紫色或灰褐色,每 2 长菌褶间有 1 片不等长的短菌褶,小菌褶至菌盖边缘长出。菌柄长 3~7.5 cm,粗 1.0~2.5 cm,圆柱形且向下渐细,上部有黏液,色同菌盖,近基部黄色,表面不光滑,似有纤维状绒毛。实心,上部往往有紫褐色纤毛状菌环。孢子印橄榄色至黑褐色。

孢子大小为 (12.2~20.6) μm × (4.5~7.2) μm,长椭圆形或梭形,淡棕色或黄棕色,中间有青黄色内含物,有小尖,有的具 2~3 个小油滴,淀粉质。担子大小为 (50~70) μm × (8~10.2) μm,棒状,顶端渐膨大,无色,4 个小梗。褶侧囊体大小为 (110.6~187.2) μm × (13.2~18.8) μm,无色,圆柱状或棒状,基部渐细,薄壁。菌褶菌丝短柱状,无色直立,有隔膜,大小为 (43.2~76.8) μm × (10.8~19.2) μm,未见锁状联合,Melzer's 试剂变蓝。菌盖表皮由排列紧密的菌丝组成,菌丝圆柱状,直立,顶端稍膨大,无色,薄壁,有隔膜,大小约 (50~110.4) μm × (6.0~9.6) μm,菌柄表皮由杂乱的菌丝组成,菌丝圆柱状,无色,直径 7.2~14.4 μm(图 1)。

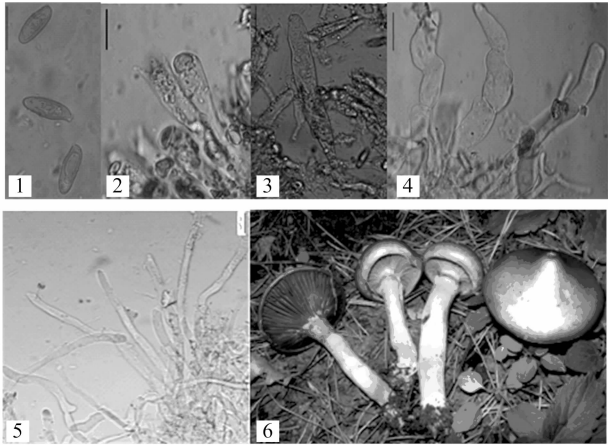


图1 色钉菇 (*Chroogomphus rutilus*) 子实体形态及显微结构  
色钉菇 (*C. rutilus*) 与黏铆钉菇 (*Gomphidius glutinosus*)、红铆钉菇 (*G. roseus*)、亚红铆钉菇 (*G. subroseus*) 均生长于我国

华北地区,外形相似,但是 *G. glutinosus* 为灰紫色,暗褐色,具黑色斑点,*C. rutilus* 菌盖偏红色,与红铆钉菇 (*G. roseus*)、亚红铆钉菇 (*G. subroseus*) 相比,*C. rutilus* 菌盖偏紫色,有时具有黄色色调,而 *G. roseus* 和 *G. subroseus* 常常是粉红色或正红色<sup>[12-13]</sup>,而且菌盖边缘往往有菌幕残留,4 种真菌都常见于松林中,在我国华北地区均有分布,可作为食用菌,但采集食用前去除黏液和菌盖表皮为宜<sup>[14]</sup>。

2.2 PCR 扩增及 ITS 序列比对结果

对供试样品基因组 DNA 的 18S rRNA、ITS1、5.8S rRNA 和 ITS2 进行扩增,结果显示 ITS 序列长约 730 bp。将该菌 ITS 序列与 NCBI 的 GenBank 数据库进行 Blast 检索比对,共得到了 18 个与供试样品具有较高相似率的序列物种(表 1)。

表 1 与供试标本 rDNA-ITS 序列最相似的物种

最相似物种	登录号	最大相似率(%)
<i>Chroogomphus rutilus</i>	KM488533.1	99
<i>Chroogomphus rutilus</i>	HM049561.1	99
<i>Chroogomphus rutilus</i>	JN084191	99
<i>Chroogomphus orientirutilus</i>	EU706325	95
<i>Chroogomphus orientirutilus</i>	EU706328	95
<i>Chroogomphus vinicolor</i>	DQ533974	92
<i>Chroogomphus purpurascens</i>	FJ481128	95
<i>Chroogomphus confusus</i>	EF423623	92
<i>Chroogomphus filiformis</i>	EU706323	92
<i>Chroogomphus jamaicensis</i>	AF205660	91
<i>Chroogomphus helveticus</i>	GU187514	90
<i>Chroogomphus roseolus</i>	EU702369	90
<i>Chroogomphus jamaicensis</i>	KC152079	90
<i>Gomphidius roseus</i>	JQ888168	89
<i>Gomphidius subroseus</i>	AY077473	89
<i>Gomphidius borealis</i>	AY077469.1	89
<i>Gomphidius glutinosus</i>	LN714548	89
<i>Rhizopogon salebrosus</i>	HQ914333	84

2.3 系统发育分析

对 ITS 序列系统发育树分析结果表明,19 个种聚为 4 大类,即美味牛肝菌 (*Boletus edulis*)、*Rhizopogon salebrosus*、铆钉菇属 (*Gomphidius*) 和铆拟钉菇属 (*Chroogomphus*),铆钉菇属 (*Gomphidius*) 和铆拟钉菇属 (*Chroogomphus*) 分别处于不同的分枝,样品 10 397 与 *C. rutilus* 聚为一类,处铆拟钉菇属 (*Chroogomphus*) 分枝上,支持率为 95%(图 2)。与 *C. orientirutilus* 亲缘关系较近,而与 *Gomphidius glutinosus*、*G. roseus*、*G. subroseus* 亲缘关系较远。

3 讨论

ITS 测序及系统发育树分析表明,色钉菇 (*C. rutilus*) 与东方色钉菇 (*C. orientirutilus*)、紫色钉菇 (*C. purpurascens*)、变色色钉菇 (*C. vinicolor*) 和易混色钉菇 (*C. confusus*) 亲缘关系较近,而与 *Gomphidius glutinosus*、*G. roseus*、*G. subroseus* 亲缘关系较远。但是 *C. orientirutilus* 菌盖亮红色、血红色,且囊状体具有块状结晶<sup>[15]</sup>,而 *C. rutilus* 菌盖紫红、咖啡红色,囊状体壁光滑;*C. purpurascens* 菌盖紫色或深紫色,菌柄橘黄色,而 *C. rutilus* 菌盖偏红色,具有紫色色调,菌柄色同菌盖,仅基部亮黄色;变色色钉菇 (*C. vinicolor*) 菌盖表面不黏,有时具细

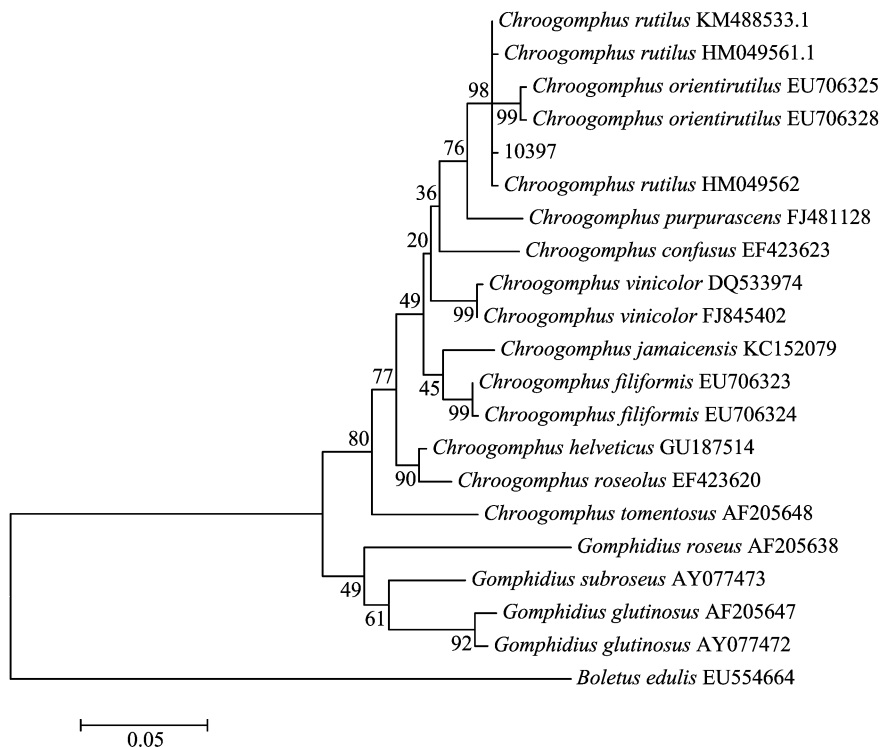


图2 供试样品及来自 GenBank 的最相似物种的 ITS 序列构建的 NJ 系统发育树

小绒毛,且囊状体壁厚,最宽处可达  $5 \sim 7.5 \mu\text{m}$ <sup>[2,16-17]</sup>,而 *C. rutilus* 菌盖湿时很黏,光滑,囊状体壁很薄;易混色钉菇 (*C. confusus*) 菌盖较小,为  $1 \sim 4\text{cm}$ ,黄棕色、橘色具有红色色调,且囊状体具结晶。而且东方色钉菇 (*C. orientirutilus*)、变色色钉菇 (*C. vinicolor*)、易混色钉菇 (*C. confusus*) 生长于在我国西南部,只有紫色钉菇 (*C. purpurascens*) 生于我国东北部,色钉菇 (*C. rutilus*) 全国都有分布。铆钉菇属 (*Gomphidius*) 和色钉菇属 (*Chroogomphus*) 同属于铆钉菇科 (Gomphidiaceae),亲缘关系较近,外形特征极其相似,很难区分,二者主要的区别是钉菇属 (*Chroogomphus*) 肉肉往往黄色或橙色,菌丝组织在 Melzer's 试剂中变蓝,而铆钉菇属 (*Gomphidius*) 主要的区别特征是菌褶幼时有菌幕,菌盖边缘往往有菌幕残留物,有时会脱落,组织非淀粉质<sup>[1,2,10]</sup>,有时这些特征不太明显,给鉴定带来一定困难。ITS 以其简便易操作、变异度丰富等特点,在真菌种及相似种的鉴定中起着很重要的作用,但由于该区片段有限,携带信息较少,在鉴定过程中存在一定的误区,将二者相结合,可使鉴定更加准确、全面。

#### 参考文献:

- [1] Miller O K. The gomphidiaceae, a monograph of the genera and species and their world distribution [D]. Michigan: University of Michigan, 1963: 1-136.
- [2] Miller O J. Monograph of chroogomphus (Gomphidiaceae) [J]. Mycologia, 1964, 56(4): 526-549.
- [3] 李华,卫敏,薛龙龙,等. 血红铆钉菇子实体中化学成分类型及多糖含量[J]. 食用菌学报, 2011, 18(4): 67-68.
- [4] 张雪倩,孙红,王立安,等. 色钉菇粗多糖对小鼠 DA 能神经元 MPTP 损伤的保护作用[J]. 菌物学报, 2011, 30(1): 77-84.
- [5] 李贞卓. 血红铆钉菇化学成分及其抗肿瘤活性的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014: 1-63.
- [6] 唐超,王清吉,葛蔚,等. 血红铆钉菇多糖对小鼠  $S_{180}$  肉瘤的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(6): 2966-2967.
- [7] 高婵娟. 血红铆钉菇多糖的制备及生物学活性分析[D]. 抚顺: 辽宁石油化工大学, 2012: 1-84.
- [8] 王守现,刘宇,张英春,等. 基于 RAPD 和 ITS 分子标记对血红铆钉菇菌株的鉴别研究[J]. 食用菌学报, 2013, 20(3): 10-14.
- [9] Li Y C, Yang Z L, Tolgor B. Phylogenetic, biogeographic relationships of *Chroogomphus* species as inferred from molecular, morphological data[J]. Fungal Diversity 2009, 38: 85-104.
- [10] Miller O K Jr. The gomphidiaceae revisited: a worldwide perspective [J]. Mycologia, 2003, 95: 176-183.
- [11] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//PCR Protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [12] 卯晓岚. 中国真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.
- [13] 邵力平,项存梯. 中国森林蘑菇[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1997: 1-652.
- [14] Zeitlemayr L. Wild mushrooms: an illustrated handbook [M]. Hertfordshire: Garden City Press, 1976: 93-94.
- [15] 李艳春. 中国广义粉孢牛肝菌属的分类及该属的系统学研究——兼论色钉菇属的分类及生物地理学[D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2009: 1-87.
- [16] Roody W C. Mushrooms of west virginia and the central appalachians [M]. Kentucky: University Press of Kentucky, 2003: 1-536.
- [17] Kuo M. *Chroogomphus vinicolor* [EB/OL]. (2007-10-20) [2015-3-25]. [http://www.mushroomexpert.com/chroogomphus\\_vinicolor.html](http://www.mushroomexpert.com/chroogomphus_vinicolor.html).