北京松山国家级自然保护区有毒大型真菌物种多样性研究*

吴记贵[1] 周 昊[2**] 侯成林[2]

(1. 北京松山国家级自然保护区管理处,北京 102115; 2. 首都师范大学生命科学学院,北京 100048)

摘要:为了填补北京松山国家级自然保护区对有毒大型真菌相关研究的空白,本研究对该保护区内的大型真菌多样性进行调查,并通过形态学和分子系统学进行分析研究. 研究显示保护区内有4目12科17种有毒真菌,导致中毒的主要类型有急性肾衰竭型、神经精神型和胃肠炎型. 此次调研为北京市有关采食有毒大型真菌致死事件的防范和教育提供一定参考,也对保护区管理提出了新的要求.

关键词:北京松山国家级自然保护区;大型真菌;毒菌;资源

中图分类号:Q939 **DOI**:10.19789/j.1004-9398.2020.04.010

0 引 言

大型真菌(Macrofungi)泛指一类子实体较大的真菌,也被称为蕈菌,属于真菌界,是一类在资源开发应用方面被广泛关注的一类真菌[1]. 早在我国古代著作中,就有对部分大型真菌鉴定、食用和栽培等方面的记载. 如多部古代著作中有多种灵芝的记载,有将块菌(*Tuber*)称为麦蕈,将食用木耳称为桑耳等[2].

大型真菌在生态系统中扮演重要的角色,而有毒大型真菌(简称毒菌)是一类含有毒素物质的真菌. 在我国,毒菌所引起的中毒类型主要包含肝损害型、胃肠炎型、神经精神型、溶血性型、呼吸循环衰竭型和光过敏皮炎型[3]. 近年来,随着生活水平的提高,人们采食野生蘑菇的需求增加,随之而来的有关采食毒菌中毒事件的报道也不断增加,对毒菌的生物毒素的研究以及毒菌资源在医药上的开发与利用引起了大家的广泛关注. 据笔者调研,北京周边大型真菌的相关研究仍较少,仅有蔡怀颊等[4]和卢维来等[5]对北京周边区域进行了大型真菌调查,这些调查的主要目的是为统计区域内大型真菌种类和分布,列出相应物种名录或优势大型真菌的科、属,为之后的研究提供了相关数据参考,但并未对详细资源真菌进行具体的分析和描述.

2017—2018年本研究对北京松山国家级自然保护区有毒大型真菌进行了调查和标本采集,并采用形态学结合分子分析对采集的标本进行鉴定.

1 基本情况

北京松山国家级自然保护区成立于1985年,位于北京市延庆区境内,地处燕山山脉的军都山中,西临河北省张家口市怀来县,北接河北省张家口市赤城县,东、南与张山营镇佛峪口、南水峪等村相邻,距市区约80 km,地理坐标为115°43′44″~115°52′38″E,40°29′05″~40°35′40″N,保护区总面积为6 212.96 hm^2.

保护区内年平均温度8.5 ℃,累积降水量493 mm,属暖温带大陆性季风气候. 保存有华北地区唯一的大片天然次生油松(*Pinus tabuliformis* Carr.)林以及由桦木(*Betula* spp.)、椴树(*Tilia tuan* Szyszyl.)、榆树(*Ulmus pumila* L.)和核桃楸(*Juglans mandshurica* Maxim.)等构成的天然次生阔叶林[6],各大主沟常年溪水潺潺,营造了复杂的野生动植物天然栖息地,致使该地生物多样性较高. 特别是近年封山育林效果明显,极大地改善了野生动植物的栖息环境,也为大型真菌的繁衍创造了条件.

收稿日期:2019-11-04

*生态环境部生物多样性调查与评估项目(2019HJ2096001006,2017HB2096001006)

**通信作者:hadrian_zhou@126.com

2　材料与方法

2.1　调查与标本采集

结合大型真菌的生长特点,调查选择在每年8—9月有连续降雨天气后进行.调查过程采取样线法和踏查法相结合的方法.对调查中遇到的大型真菌单独编号,记录生长环境、特征和营养类型等详细信息.采集大型真菌个体,通过烘干制成标本,用于后期DNA提取和鉴定,标本保存在首都师范大学生命科学学院标本馆(BJTC).

2.2　标本鉴定

2.2.1　形态学鉴定

有毒大型真菌标本通过形态特征与已知文献[1,7-9]对比进行初步鉴定.通过标本和野外拍摄的图片观察宏观特征,包括大小、颜色、形态特征和气味等;在日本奥林巴斯株式会社生产的BX51型光学显微镜下观察微观特征,包括担子、子囊、菌丝和孢子大小等.

2.2.2　分子鉴定

(1)DNA提取.对形态学鉴定一致的标本,选取代表性标本进行DNA提取,DNA提取采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法.首先,向研磨充分的样品中加入预热好的提取缓冲液,70 ℃金属浴30 min;再向样品中加入500.0 μL的氯仿与异戊醇混合液(体积比为24∶1),迅速混匀,10 000 r/min离心5 min,离心半径9 cm(离心半径下文相同);收集上层水相转移到新离心管中,加入2倍体积的无水乙醇为沉淀缓冲液,混匀,13 000 r/min离心15 min,收集沉淀;将沉淀物溶于350.0 μL浓度为2 mol/L氯化钠(NaCl)溶液中,加入RNA酶5.0 μL,37 ℃酶解1 h,之后加入350.0 μL氯仿与异戊醇混合液,混匀,室温10 000 r/min离心5 min;吸取上清液到新的离心管中,加入提前-20 ℃预冷的180.0 μL异戊醇中,混匀,在-20 ℃保存15 min,取出后在4 ℃ 13 000 r/min条件下离心20 min,收集沉淀;将最终沉淀物悬浮于1.0 mL的体积分数为70%乙醇溶液中,在4 ℃ 13 000 r/min条件下离心3 min,收集沉淀,并重复该步骤1次并洗脱;收集DNA沉淀,干燥后溶于TE缓冲液或无菌去离子水中,-20 ℃保存[10].

其中主要溶液的配制如下:①1 mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)-盐酸(HCl)缓冲液:每100.0 mL溶液中加入Tris碱12.1 g,用浓HCl调节到pH 8.0,加蒸馏水定容到100.0 mL,高压灭菌.②0.5 mol/L乙二胺四乙酸(EDTA)溶液:在400.0 mL蒸馏水中加入90.0 g二水乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na2H_2O),搅拌溶解,用氢氧化钠(NaOH)调节到pH 8.0,加蒸馏水定容到500.0 mL,高压灭菌.③2 mol/L NaCl溶液:116.9 g NaCl溶于蒸馏水中,定容到1.0 L,高压灭菌.④提取缓冲液:在70.0 mL蒸馏水中加入CTAB 4.0 g、NaCl 16.4 g、1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 20.0 mL、0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 8.0 mL,溶解后定容至200.0 mL,高压灭菌.⑤TE缓冲液:在400.0 mL蒸馏水中加入1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 5.0 mL、0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 1.0 mL,定容至500.0 mL后高压灭菌.

(2)聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增.PCR反应体系:DNA模板2.0 μL,上下引物各1.0 μL,PCR反应混合物(Mix)12.5 μL,无菌二次蒸馏水8.5 μL,引物选用核糖体内转录间隔区域(internal transcribed spacer, ITS)的ITS 1F和ITS 4对提取的DNA进行扩增.PCR反应条件为:95 ℃ 5 min,之后进行35个循环重复反应(95 ℃ 30 s;55 ℃ 30 s;72 ℃ 60 s),最后72 ℃ 10 min[11].PCR产物送北京中科希林生物科技有限责任公司进行测序.

(3)构建系统发育树.构建系统发育树的序列来自于采集标本扩增得到的ITS序列和从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站下载得到的相关物种最近发表的可靠的ITS序列.采用Mafft v.6软件(https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/)对全部序列进行多序列比对[12],采用Gblocks 0.91b对序列进行调整剪切,处理完成的序列采用MrBayes v.3.1.2进行贝叶斯分析,构建系统发育树[13].采用马尔可夫链蒙特卡罗(markov chain monte carlo, MCMC)算法进行贝叶斯推理(bayesian inference, BI)分析[14],MrModeltest v. 2.3被用来估计最佳模型.2个MCMC链从随机树中运行了10 000 000代,当分裂频率的平均标准偏差降至0.01以下时停止,树每1 000代保存1次.每次分析的前25%的树被丢弃.在剩下的树中估计具有显著贝叶斯后验概率(bayesian posterior probabilities, BPP)的分支[15].

3　结　果

3.1　基本概况

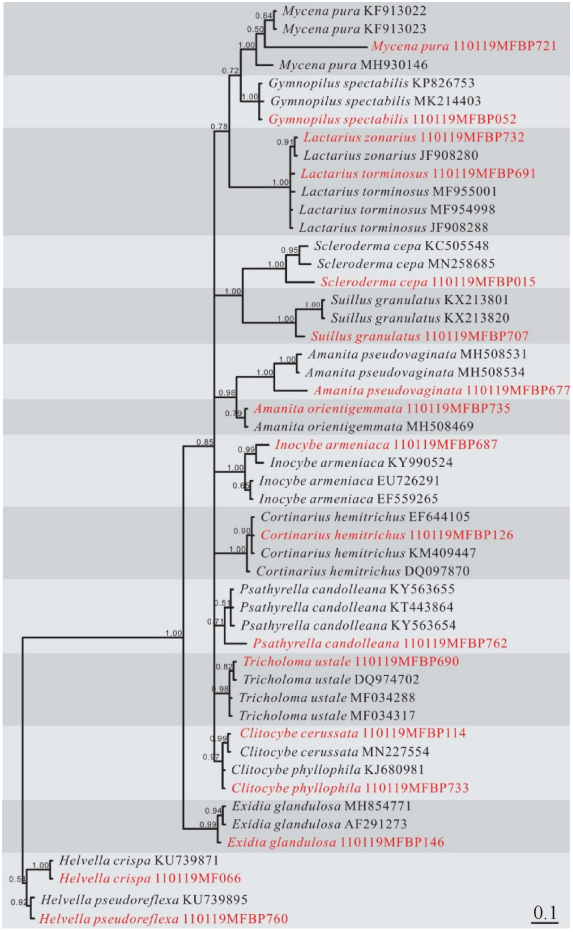
2017—2018 年间,本研究在北京松山国家级自然保护区内共开展了 3 次大型真菌多样性调查,共采集标本 200 余份. 结合形态学和分子数据鉴定结果,参考 Wu 等[16]对中国可食用、药用和有毒大型真菌资源的统计,保护区内采集得到的大型真菌中含有毒菌 17 种,隶属于 4 目 12 科 13 属,详细名录列于表 1.

表 1　北京松山国家级自然保护区有毒大型真菌名录

亚门	目	科	种
子囊菌亚门	盘菌目	马鞍菌科	皱马鞍菌,拟展马鞍菌
担子菌亚门	伞菌目	鹅膏科	东方黄盖鹅膏,假灰托鹅膏
		丝膜菌科	半毛盖丝膜菌
		丝盖伞科	亚美尼亚丝盖伞
		小菇科	洁小菇
		小脆柄菇科	黄盖小脆柄菇
		红菇科	疝疼乳菇,轮纹乳菇
		球盖菇科	桔黄裸伞
		口蘑科	毒杯伞,落叶杯伞,褐黑口蘑
	木耳目	木耳科	黑耳
	牛肝菌目	硬皮马勃科	光硬皮马勃
		乳牛肝科	点柄乳牛肝菌

3.2　ITS 系统发育树

对保护区有毒大型真菌采用贝叶斯分析构建的 ITS 系统发育树如图 1 所示. 其中子囊菌中的皱马鞍菌(*Helvella crispa* Bull)、拟展马鞍菌(*Helvella pseudoreflexa* Q Zhao, Zhu L Yang & K D Hyde)与其他的担子菌分成了明显 2 支. 同时标本自测序列与下载序列在系统发育上的关系,也为本研究的物种鉴定提供了较好的支持.



注:数字代表贝叶斯分析的后验概率;黑色字体物种表示从 NCBI 数据库下载的序列 + GenBank 登录号;红色字体物种表示保护区内采集的标本序列 + 采集标本号;ITS. 核糖体内转录间隔区域.

图 1　北京松山国家级自然保护区有毒大型真菌 ITS 系统发育树

3.3　常见毒菌及致毒类型

综合野外调查和采集标本记录,北京松山国家级自然保护区常见有毒真菌有 6 种(图 2),分别是轮纹乳菇[*Lactarius zonarius* (Bull) Fr]、光硬皮马勃[*Scleroderma cepa* Pers]、落叶杯伞[*Clitocybe phyllophila* (Pers) P Kumm.]、点柄乳牛肝菌[*Suillus granulatus* (L) Roussel]、黄盖小脆柄菇[*Psathyrella candolleana* (Fr) Maire]和洁小菇[*Mycena pura* (Pers) P Kumm]. 结合陈作红[17]的研究,能确定部分北京松山国家级自然保护区有毒真菌致毒类型. 如:半毛盖丝膜菌[*Cortinarius hemitrichus* (Pers) Fr]会致急性肾衰竭型中毒,该菌含有奥莱毒素物质,发病潜伏期较长,误食后易出现腹痛、呕吐、腹泻、少尿及肝转氨酶上升的症状;东方黄盖鹅膏[*Amanita orientigemmata* Zhu L Yang & Yoshim Doi]、落叶杯伞、洁小菇、桔黄裸伞[*Gymnopilus spectabilis* (Fr) Singer]等会致神经精神型中毒,该类菌含有毒蕈碱、异恶唑衍生物等有毒物质,误食后发病快,多出现眩晕、兴奋、恶心和呕吐等症状;导致胃肠炎型中毒的毒菌有黑耳[*Exidia glandulosa* (Bull) Fr]、轮纹乳菇[*Lactarius zonarius* (Bull) F]、光硬皮马勃和点柄乳牛肝菌等,误食后发病快,症状以腹泻、腹痛、恶心和呕吐为主. 经过调查,在松山附近区域的市场上,点柄乳牛肝菌也是一种较为常见的食用野生菌. 该菌由于部分有毒,在食用

前只要充分加热至熟,食用后并不会产生中毒症状[7].但并不是所有有毒真菌加热至熟后毒性都会消失,建议大家在野外不要擅自采集食用野生菌.



图 2　北京松山国家级自然保护区常见有毒大型真菌

(a)轮纹乳菇;(b)光硬皮马勃;(c)落叶杯伞;(d)点柄乳牛肝菌;(e)黄盖小脆柄菇;(f)洁小菇

4　讨　论

北京松山国家级自然保护区成立于 1985 年,1986 年经国务院批准为森林和野生动物类型的国家级自然保护区,2014 年保护区进行了范围和功能区调整,同时对保护区各功能区域严格划分,保护区的重要保护对象天然油松林、落叶阔叶次生林和其他野生动植物资源主要分布在核心区内,保护区核心区实行绝对保护、封闭管理和禁止采伐等一切破坏活动.与此同时,有严格的管理制度和完善的管理团队.这些因素都为大型真菌发生提供了良好的条件.

蔡怀頫等[4]2003 年对北京松山国家级自然保护区进行了一次大型真菌调查,共鉴定大型真菌 31 种,其中包含有毒真菌 6 种,分别是冠状环柄菇[*Lepiota cristata* (Bolt:Fr) Quel]、花盖小脆柄菇[*Psathyrella multipedata* (Imai) Hongo]、覆瓦网路菌[*Paxillus curtisii* Berk]、白乳菇[*Lactarius plperatus* (L:F) Gray]、中华散尾鬼笔[*Lysuras mokusinfsinensis* (lioyd) Kobnyasi]和苦粉泡牛肝菌[*Tylopilus felleus* (Bull:Fr) Karst].本研究此次调查的 17 种有毒真菌并没有与之前的记录重复,故随着在北京松山国家级自然保护区内调查的深入,还有可能发现和记录更多的有毒真菌.

以前大众对大型真菌资源关注度较低,同时对松山及周边区域大型真菌的调查研究较为缺乏[5],详细描述有毒真菌的文献较少.保护区内对生物多样性的保护监管也未涉及大型真菌类群.此次针对北京松山国家级自然保护区内有毒真菌的研究,既符合当前对真菌资源关注的背景,也增加了保护区生物数据的多样性和丰富性,对保护区内生物多样性保护和管理,也提出了新的关注点、理念和要求.

目前,随着人们生活水平的不断提高,对可食用野生菌资源的需求在不断增加,大型真菌资源受到了前所未有的关注.与此同时,云南、广东、贵州和浙江等地因采食野生菌导致中毒致死事件频频发生,相关研究也在逐步深入[17-21],这使得了解调查毒菌的意义也更为重要.北京松山国家级自然保护区目前处于封闭管理状态,待后期开放,会迎接大量游客参观游览.为避免随意采集并误食有毒真菌的意外事件发生,本研究通过调查摸清保护区内有毒真菌的种类和分布,为保护区管理处对游客提前进行相关教育和警示,以及保护区工作人员管理和科普宣教上有十分重要的意义.

参 考 文 献

[1] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.
[2] 图力古尔. 蕈菌分类学[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
[3] 陈作红,杨祝良,图尔古力,等. 毒蘑菇识别与中毒防治[M]. 北京: 科学出版社, 2016.
[4] 蔡怀頫,刘红霞,郭一妹,等. 北京松山自然保护区大型真菌调查初报[J]. 生态科学, 2003, 22(3): 250 - 251.
[5] 卢维来,魏铁铮,王晓亮,等. 北京地区大型真菌多样性分析[J]. 菌物学报, 2015, 34(5): 982 - 995.
[6] 李黎立,蒋万杰,吴记贵,等. 北京松山自然保护区生物多样性现状与保护对策[J]. 林业调查规划, 2008, 33(5): 51 - 54.
[7] 杨祝良. 中国鹅膏科真菌图志[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
[8] 王立安,通占元. 河北省野生大型真菌原色图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
[9] 李玉,李泰辉,杨祝良,等. 中国大型菌物资源图鉴[M]. 郑州: 中原农民出版社, 2015.
[10] GARDES M, BRUNS T D. Its primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Molecular Ecology, 1993, 2 (2): 13 - 118.
[11] ZHOU H, HOU C L. Three new species of *Diaporthe* from China based on morphological characters and DNA sequence data analyses[J]. Phytotaxa, 2019, 422(2): 157 - 174.
[12] KATOH K, TOH H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program[J]. Bioinformatics, 2010, 26 (15): 1899 - 1900.
[13] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572 - 1574.
[14] RANNALA B, YANG Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference [J]. Journal of Molecular Evolution, 1996, 43(3): 304 - 311.
[15] POSADA D, CRANDALL K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution[J]. Bioinformatics, 1998, 14(9): 817 - 818.
[16] WU F, ZHOU L W, YANG Z L, et al. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species[J]. Fungal Diversity, 2019, 98(1): 1 - 76.
[17] 陈作红. 2000 年以来有毒蘑菇研究新进展[J]. 菌物学报, 2014, 33(3): 493 - 516.
[18] 邓旺秋,李泰辉,宋斌,等. 广东已知毒蘑菇种类[J]. 菌物研究, 2005, 3: 7 - 12.
[19] 周静,袁媛,郎楠,等. 中国大陆地区蘑菇中毒事件及危害分析[J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25(6): 419 - 424.
[20] 孙亮,陈莉莉,廖宁波,等. 2010—2016 年浙江省毒蘑菇中毒流行病学分析[J]. 中国食品卫生杂志,2018, 30(3): 270 - 274.
[21] 罗宏. 毒蘑菇的组学研究[J]. 菌物学报, 2019, 38(10): 1 - 12.

Diversity of Poisonous Macrofungi in Beijing Songshan National Nature Reserve

WU Jigui[1] ZHOU Hao[2] HOU Chenglin[2]

(1. Beijing Songshan National Nature Reserve Management Office, Beijing 102115;
2. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048)

Abstract: In order to fill the gap in the research on poisonous macrofungi in Beijing Songshan National Nature Reserve, this study investigated the diversity of macrofungi in the reserve and analyzed it through morphology and molecular phylogeny. The study showed that there were 4 orders, 12 families and 17 species of poisonous fungi in the protected area, and the main poisoning types were acute renal failure, neuropsychiatric and gastroenteritis. The investigation provides some reference for the prevention and education of death incidents caused by the collection and consumption of poisonous fungi in Beijing, and also put forward new requirements for the management of Beijing Songshan National Nature Reserve.

Keywords: Beijing Songshan National Nature Reserve; macrofungal; toxin; resource