

# 红汁乳菇、半血红乳菇及橙色乳菇的 rDNA ITS 序列分析

李 河, 周国英\*, 刘君昂

(中南林业科技大学 资源与环境学院, 湖南 长沙 410004)

**摘要:** 从分子角度对红汁乳菇(*Lactarius hatsudake*)、半血红乳菇(*Lactarius semisanguifluus*)及橙色乳菇(*Lactarius akahatsu*)的分类地位进行了阐述。利用真菌通用引物对湖南衡阳的红汁乳菇 rDNA 的转录间隔区(ITS)进行扩增、测序。所得序列与 GenBank 中的半血红乳菇及橙色乳菇的 ITS 序列比较, 最后得出 *Lactarius semisanguifluus* 和 *Lactarius hatsudake* 是同物异名, 而 *Lactarius semisanguifluus* 和 *Lactarius akahatsu* 则不是同种的结论; 试验中还发现 GenBank 中的 AF096988 *Lactarius semisanguifluus* 是错误的命名种, 应该是乳菇属中的松乳菇。

**关键词:** 红汁乳菇; 半血红乳菇; 橙色乳菇; ITS 分析

中图分类号: S646 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2007)12-0088-04

## rDNA ITS Analysis of *Lactarius hatsudake*, *Lactarius semisanguifluus* and *Lactarius akahatsu*

LI He, ZHOU Guo-ying, LIU Jun-ang

(College of Resource & Environment, Central South University of Forestry and Technology,  
Changsha 410004, China)

**Abstract:** The rDNA ITS of *Lactarius hatsudake* from Hengyang, Hunan Province was amplified using common primers of fungi and sequenced, the sequence of which was compared with those of *Lactarius semisanguifluus* and *Lactarius akahatsu* from GenBank. The result showed that *Lactarius semisanguifluus* is the same species to *Lactarius hatsudake*, and *Lactarius semisanguifluus* is different from *Lactarius akahatsu*. Besides, the AF096988 *Lactarius semisanguifluus* in GenBank was wrongly named and should be *Lactarius deliciosus*.

**Key words:** *Lactarius hatsudake*; *Lactarius semisanguifluus*; *Lactarius akahatsu*; ITS analysis

红菇科中的乳菇属(*Lactarius*)是一类肉质细嫩, 味道鲜美独特, 营养丰富的食、药两用经济真菌。其中部分种的多糖提取物对肉瘤-180 和艾氏腹水癌有抑制作用<sup>[1]</sup>。传统真菌分类的主要依据是子实体宏观或微观的形态结构特征, 但表型特征受环境影响较大, 这就使得在不同环境条件下生长的同一种真菌经常表现出较大的形态差异, 造成以形态结构特征分类结果具有一定的局限性。现代生物技术表明, 以 DNA 核苷酸序列为基础的基因型则相对稳定, 因此, 采用 DNA 分子序列进行物种分类和鉴

别, 结果更加准确可靠。王向华<sup>[2]</sup>根据显微结构及外部形态讨论了红汁乳菇(*Lactarius hatsudake*)、半血红乳菇(*Lactarius semisanguifluus*)及橙色乳菇(*Lactarius akahatsu*)的分类关系, 认为 *Lactarius semisanguifluus* 为 *Lactarius akahatsu* 的异名, 并与 Singer 的看法一致; 同时, 认为毕志树等<sup>[3]</sup>将 *Lactarius semisanguifluus* 作为 *Lactarius hatsudake* 的异名处理不合适。针对上述 3 种乳菇分类存在的分歧, 利用 PCR 和基因测序技术对它们的核糖体 DNA 的 ITS 区序列进行分析, 阐述了它们

收稿日期: 2007-08-10

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(01JJY2076)

作者简介: 李 河(1979-), 男, 湖南永州人, 助教, 硕士, 主要从事应用真菌的研究。

通讯作者: 周国英(1966-), 女, 湖北应城人, 教授, 博士生导师, 主要从事林业微生物的教学与研究。

的分类地位及相互关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验用 *Lactarius hatsudake* 材料(编号: lihe016)采自湖南衡山,经中南林业科技大学周国英教授鉴定。

### 1.2 方法

1.2.1 子实体 DNA 的提取 用硅胶干燥 *Lactarius hatsudake* 子实体至硅胶无颜色变化:① 样品+石英砂+PVP,在液氮中冷冻后迅速研磨至粉末状;② 加入预热的 4×CTAB(混有 PVP、巯基乙醇) 700 $\mu$ L, 65 $^{\circ}$ C 水浴 2h;③ 加入等体积的氯仿-异戊醇混合液(24:1) 700 $\mu$ L, 轻摇 3~5 min, 13000 r/min 离心 10 min 后取上清,重复 1 次;④ 加 700 $\times$  2/3 $\mu$ L 的异丙醇(预冷-20 $^{\circ}$ C)抽提,加入 NaAC 轻摇、13000 r/min 离心 10 min, 弃上清;⑤ 200 $\mu$ L 70%乙醇洗 2 次, 13000 r/min 离心 2 min 弃上清;⑥ 200 $\mu$ L 100%乙醇洗 1~2 次, 13000 r/min 离心 2 min 弃上清,放入 37 $^{\circ}$ C 烘箱干燥;⑦ 加双蒸水 30 $\mu$ L, 2 $\mu$ L RNA 酶,在 DNA 样品中混合均匀,放入 36 $^{\circ}$ C 烘箱保温大于 30 min, 除去 RNA。

### 1.2.2 rDNA ITS PCR 扩增

1.2.2.1 引物 本试验采用引物为真菌通用引物,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

ITS1: TCCG TAGG TGAACCTGCGG

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC

1.2.2.2 PCR 反应体系(25 $\mu$ L) 10 $\times$  缓冲液 2.5 $\mu$ L, dNTP(各 2.5 mmol/L) 1 $\mu$ L, 引物各 1 $\mu$ L, Taq 酶(5 $\mu$ / $\mu$ L) 0.25 $\mu$ L, 模板 DNA 1 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.25 $\mu$ L。

1.2.2.3 PCR 反应条件 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.3 PCR 扩增产物测序 将 PCR 扩增产物纯化后克隆至 PMD18-T 质粒上,再转化至 *E. coli* 感受态细胞中,采用含 X-Gal, IPTG, Amp LB 蓝白斑平板法筛选克隆成功的菌落,阳性克隆用液体

LB 培养基培养。挑取白色菌落培养做 PCR 检测,剔除假阳性菌株,对克隆成功的菌株送上海生工生物工程技术服务有限公司做正反双向测序,以保证测序的准确率,利用 Bioedit 软件拼接得完整序列。

1.2.4 rDNA ITS 序列分析 在 GenBank 核酸序列数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih>)中搜索并下载它们 *Lactarius hatsudake*, *Lactarius semisanguifluus* 和 *Lactarius akahatsu* 及乳菇属其他部分种的 ITS 序列(含 5.8S 区)与本试验所测的衡阳 *Lactarius hatsudake* (编号: lihe016) rDNA ITS 序列利用 ClustalX 软件将序列匹配排列,用 MEGA 3.1 软件基于 Kimura2-parameter 模型计算遗传距离,并采用近邻归群法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,以红菇属中的 *Russula vinosa* 作为外群,经 bootstrap 法,1000 次循环检验系统树的可靠性。

## 2 结果与分析

### 2.1 rDNA ITS 区 PCR 扩增结果

*Lactarius hatsudake* 的 rDNA ITS 区(含 5.8S 区)PCR 扩增电泳结果见图 1。从图 1 可以看出,ITS 区 PCR 扩增的条带特异、效果好。rDNA 用 TIANGEN 公司生产的 TIANquick Midi Purification DNA 纯化试剂盒纯化后用于下一步的克隆、测序。

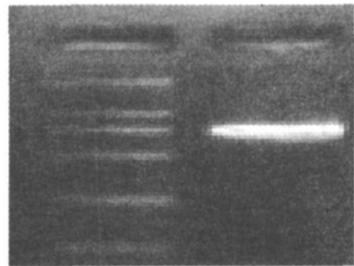


图 1 rDNA ITS 区 PCR 扩增电泳图谱

### 2.2 rDNA ITS 区测序结果

*Lactarius hatsudake* 的 rDNA ITS 区测序所用测序仪器为 ABI PRISM 3730, 测序试剂为 BigDye terminator v3. 1. lihe0016 号菌 rDNA ITS 区段(含 5.8S 区)长度为 686 bp, 序列结果如下:

```

1 - 70   TCGTACAACGTGTGTGAGGCGTGTGAGGGCTGTCGCTGACTTTTTGACACAAAAGTCGTGCACGCCGGAG
71-140  CAGCTCTCTCTCTCACATAAAATCCATCTCACCCCTTTTGTGCACCACCGCGGGACCCCTTTGGGATG
141-210 CTTGCGTTTTACACAAAACCCCTTTTAAAAAAGTGTAGAATGACCCCACTTTGCGATGACACGCAATCAA
211-280 TACAACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATG
281-350 TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCA
351-420 CACCCGTTTGAGTGTGCGTAAAAATCTCAACCTTCTCGGTTTTCTTCTGGACACCGAAGGAGGCTTGGACT
421-490 TTGGAGGCTTTTGTGGCGTCTCTAGAGCCAGCTCCTTAAATGAATTAGCGGGTCTCTTTGCCG
491-560 ATCCTTGACATGTGATAAGATGTTCCATGACTCGGTTTCTGGCTCTGTTGCAATTGGGACCTGCTCTTA
561-630 ACCGCTCTGACGAGACGATGTTTGGGAGTGTCTCCCTTCTCGGGAGACTCTCTCGACCCACGAAACCTT
631-686 GACCTCAAATCGGGTGAGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGGAGGA

```

### 2.3 *Lactarius hatsudake* 与 *Lactarius semisanguifluus* 和 *Lactarius akahatsu* ITS 遗传距离

Renske 等<sup>[4]</sup>认为,通过 ITS 区域比对,序列相似性大于 99%,鉴别为相同种;序列相似性大于 95%,且小于 99%,鉴别为相同属;序列相似性小于 95%,鉴别为相同科。把本次所测衡阳 lihe016 号 *Lactarius hatsudake* 的 ITS 区序列与 GenBank 中的 *Lactarius semisanguifluus* 和 *Lactarius akahatsu* ITS 序列利用 MEGA3.1 软件计算遗传距离,结果见表 1。

表 1 *Lactarius hatsudake* 与其他乳菇 ITS 区序列遗传距离

项目	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]
[1]								
[2]	0.013							
[3]	0.028	0.033						
[4]	0.033	0.038	0.008					
[5]	0.026	0.031	0.005	0.006				
[6]	0.026	0.030	0.010	0.010	0.005			
[7]	0.026	0.030	0.010	0.010	0.005	0.000		
[8]	0.035	0.035	0.035	0.040	0.037	0.035	0.035	

注: [1] EF141556 *L. akahatsu*, [2] EF141544 *L. akahatsu* [3] EF141555 *L. hatsudake*, [4] lihe016 *L. hatsudake*, [5] EF141545 *L. hatsudake*, [6] DQ116911 *L. semisanguifluus* [7] DQ116910 *L. semisanguifluus* [8] AF096988 *L. semisanguifluus*

从表 1 可以看出, [3]、[4]、[5]、[6]、[7] 号等 5 株菌之间的遗传距离为 0~0.010, 即同源性大于 99%, 说明这 5 株菌亲缘关系非常近, 提示 *Lactarius semisanguifluus* 菌可能是 *Lactarius hatsudake* 的异名; [1]、[2] 号 *Lactarius akahatsu* 与其他菌株的遗传距离为 0.026~0.038, 即同源性小于 99%, 说明这两株菌与其他菌株关系较远, 提示 *Lactarius akahatsu* 不太可能是 *Lactarius semisanguifluus* 的异名; [8] 号 AF096988 *Lactarius semisanguifluus* 菌株与其他菌株的遗传距离为 0.035~0.040, 提示 GenBank 中的 AF096988 *Lactarius semisanguifluus* 可能是一个错误的命名种。

### 2.4 乳菇属系统发育树的构建

通过构建系统树也是一种很好的鉴定种的方法, Taylor 等提出的 GCPS (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition) 方法对鉴定种更具有科学严谨性<sup>[5]</sup>。从 GenBank 中下载乳菇属部分种的 ITS 序列与本试验所测得 *Lactarius hatsudake* 的 ITS 序列构建 NJ 系统发育树, 见图 2。从 NJ 系统树中可以看出 *Lactarius hatsudake* 和 *Lactarius semisanguifluus* 以 100% 的高置信度聚在一支上, 说明它们是同一个乳菇种, 即 *Lactarius semisanguifluus* 是 *Lactarius hatsudake* 的异名, 这与毕志树等<sup>[3]</sup>将 *Lactarius semisanguifluus* 作为 *Lactarius hatsudake* 的异名一致; 同时还可以看出

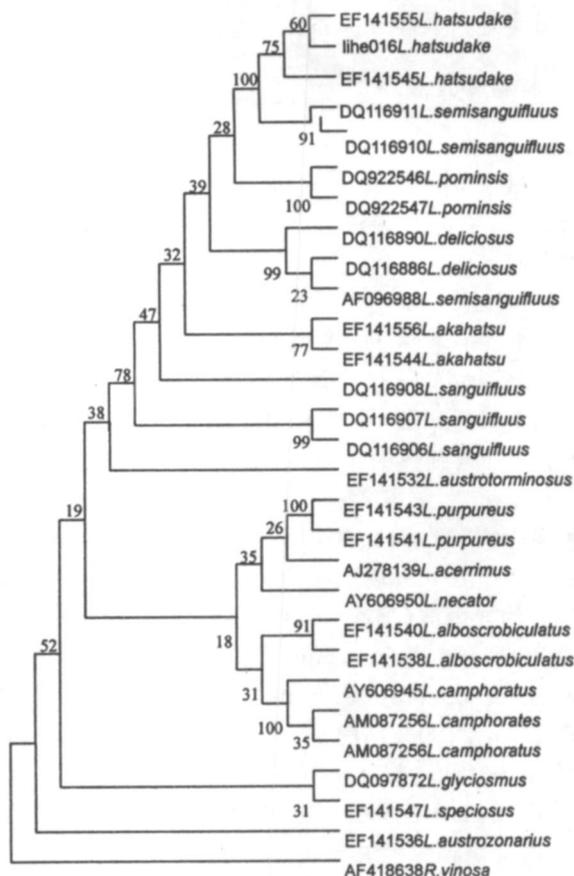


图 2 基于乳菇属 rDNA ITS 序列构建的 NJ 系统发育树 *Lactarius akahatsu* 簇在系统树中独立于 *Lactarius semisanguifluus* 簇之外, 并不支持它们归为同一个种, 国内有文献将 *Lactarius semisanguifluus* 作为 *Lactarius akahatsu* 的异名处理, 显然这一归并是不合适的; 此外, 从系统树中还可以看出 GenBank 中的 AF096988 *Lactarius semisanguifluus* 以 99% 的高置信度与 *Lactarius deliciosus* 归为一支, 而不与其它的 *Lactarius semisanguifluus* 聚类, 提示它可能是一个错误的命名种, 应该是乳菇属中的松乳菇种 *Lactarius deliciosus*。

### 3 结论

ITS (Internal transcribed spacers) 是 rDNA 中介于 18S 和 5.8S 之间 (ITS1) 以及 5.8S 和 26S 之间 (ITS2) 的非编码转录间隔区。它包括 3 个部分: 5.8 亚基、ITS1 和 ITS2 两个间隔区。该区可以直接用于 PCR 扩增, 具有高度重复性, 在长度上高度保守性和在科、属、种水平上的高度特异性, 因此已经被广泛应用作一种分子标记, 进行系统发育研究和物种鉴定<sup>[6]</sup>。本试验基于乳菇的 ITS 序列构建系统发育树, 发现 *Lactarius semisanguifluus* 和 *Lactarius hatsudake* 是同一个种, (下转第 109 页)

由表 3 可看出, 第一主成分的贡献率为 65.29%, 特征根为 3.9173, 特征向量以瘦肉率( $x_6$ )最大; 说明第一主成分值越大, 瘦肉率越高, 称之为瘦肉因子。第二主成分的贡献率为 17.04%, 特征根为 1.0224, 特征向量以屠体率( $x_1$ )最大(0.9112), 且与其他性状间的相关程度很弱, 可单独描述鸭的屠宰性能特征, 称之为特征因子。第三主成分的贡献率为 12.62%, 特征根为 0.7571, 特征向量以腿肌率( $x_5$ )最大, 说明第三主成分值越大, 腿肌率越大, 称之为腿肌因子。

### 2.3 杂交效果分析

本研究选取前 3 个主成分, 将不同杂交组合各性状标准化表型值的平均数分别代入主成分表达式, 得到相应的主成分值  $P_i$ , 从而计算出不同杂交组合的杂交效果综合值  $Y_k$ , 见表 4。由表 4 可知, 在 3 个杂交组合中, 以 LBLY 即(绿×北)×(绿×樱)组合最好, LBY 即(绿×北)×樱组合次之, LBLJ 即(绿×北)×(绿×江)组合较差。LBY 瘦肉率高于 LBLY, 但其他指标较低; 而 LBLJ 则所有指标都较 LBLY 低。

表 4 标准化主成分值及杂交效果综合排序

杂交组合	$P_1$	$P_2$	$P_3$	$Y_k$	排序
LBLY	0.8980	0.9854	-0.2699	0.7201	1
LBLJ	0.8530	0.9777	-0.2616	0.6905	3
LBY	0.8898	0.9531	-0.2455	0.7124	2

### 3 讨论

该项研究利用主成分分析把 6 个指标综合成了 3 个复合指标, 3 个特征根的累计贡献率达 94.95%, 完全反映了原指标的信息; 并以此为基础, 建立了综合评定杂交效果的线性方程, 对 3 个杂交组合杂交效果进行了排序。综合排序结果表明, LBLY 的杂交效果最好, 这是因为其既保持了北京鸭和樱桃谷

鸭瘦肉率高的优点, 其含有的 1/2 绿头野鸭血统又使其继承了绿头野鸭肉质好的特点, 相对于 LBY 较暗淡的肉色和 LBLJ 较低的瘦肉率而言, 不失为最佳的杂交组合。但对于品系(品种)培育而言, 还需要在后代中保持这种优势的稳定性, 需要进一步的选育。

### 参考文献:

- [1] 陈国宏, 王克华, 王玉, 等. 中国禽业遗传资源[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004.
- [2] 李助南, 唐登华, 程泽信. 绿头野鸭与樱桃谷鸭杂交效果的观测[J]. 湖北农业科学, 2007, 46(2): 276-278.
- [3] 张敬虎, 殷裕斌, 程太平. 绿头野鸭与北京鸭杂交一代生长发育和产肉性能的观察[J]. 当代畜牧, 2000(3): 36-37.
- [4] 殷裕斌, 张敬虎. 绿头野鸭屠体品质研究[J]. 湖北农学院学报, 2000(2): 147-148.
- [5] 唐登华, 殷裕斌. 两种三元杂交鸭自繁后代屠宰性能的比较研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007(3): 45-46.
- [6] 张敬虎. 利用绿头野鸭改善肉鸭品种皮脂率初探[J]. 中国家禽, 2000(4): 32-33.
- [7] 高惠璇. 实用统计方法与 SAS 系统[M]. 北京: 北京大学出版社, 2001.
- [8] 鲁绍雄, 连林生. SAS 统计分析系统在畜牧科学中的应用[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003.
- [9] 唐爱发, 连林生, 李爱云. 撒坝猪体尺性状的聚类分析与主成分分析[J]. 辽宁畜牧兽医, 2000(3): 1-2.
- [10] Rougoor C W, Sundaram R, van Arendonk J A M. The relation between breeding management and 305-day milk production, determined via principal components regression and partial least squares[J]. Livestock Production Science, 2000, 66: 71-83.
- [11] Kleczek K, Wawro K, Wilkiewicz Wawro E. Multiple regression equations to estimate the content of breast muscles, meat, and fat in Muscovy Ducks[J]. Poultry Science, 2006, 85: 1318-1326.

(上接第 90 页)

*Lactarius semisanguifluus* 和 *Lactarius akahatsu* 是两个不同的种, GenBank 中的 AF096988 *Lactarius semisanguifluus* 可能是一个错误的命名种, 而是乳菇属中的 *Lactarius deliciosus*。

### 参考文献:

- [1] 陈书明, 王勤. 灵芝及多糖生物活性初探[J]. 食用菌学报, 1997, 4(2): 40-42.
- [2] 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.
- [3] 毕志树. 粤北山区大型真菌志[M]. 广州: 广东科技出版社, 1990: 298.

- [4] Renske L, Paula L, Thanw K, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 327-333.
- [5] Taylor, David J. Phylogenetic species recognition and species concepts on fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 2000, 31: 21-32.
- [6] DAI Wei-tian, ZHANG Ping. ITS sequence analysis of several lethal amanita species in China[J]. Life Science Research, 2006, 10(3): 110-112.