研究报告

松乳菇组织分离菌株的 rDNA ITS 序列分子鉴定*

熊　涛　肖　满**　曾哲灵　万冬满

(南昌大学生命科学学院食品科学教育部重点实验室　南昌　330047)

摘要：对松乳菇子实体和组织分离菌株 rDNA ITS 区域进行测序分析，通过和 GenBank 中已知的乳菇属的种进行序列比对，构建系统发育树，通过树图分析，鉴定出分离菌株就是松乳菇的纯菌种。

关键词：松乳菇，ITS 序列，分离菌株

中图分类号：Q93　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2654 (2006) 04-0001-04

Molecular Identification of Isolate of *Lactarius deliciosus* by ITS Analysis*

XIONG Tao　XIAO Man**　ZENG Zhe-Ling　WAN Dong-Man

(*College of Life Science, Key Laboratory of Food Science of MOE, Nanchang University, Nanchang* 330047)

Abstract: In this study, the rDNA ITS sequence of isolate of *Lactarius deliciosus* (L.) Gray was sequenced. Molecular identification was accomplished using phylogenetic tree analysis of 22 *Lactarius* nrDNA-ITS nucleotide sequence including the 2 new and 20 GenBank sequence.

Key words: *Lactarius deliciosus*, ITS sequence, Isolate

松乳菇是对林木生长有重要意义的外生菌根真菌，又是有重要经济价值的食用真菌。但目前尚不能人工栽培出松乳菇子实体，无法令人信服地证明所分离到的菌株就是目标菌株且没有杂菌污染。因此，对子实体分离菌株的分子鉴定就尤为重要。

基于分子生物技术和生物信息学的快速发展，越来越多的外生菌根真菌 ITS 区域的序列测定结果向 GenBank、EMBL、DDBJ 3 大数据库提交，而且通过数据库 rDNA ITS 序列检索鉴定外生菌根真菌的种已成功的应用在一些研究中[1-4]。

本文对采自江西吉安的松乳菇子实体（通过形态学、解剖学和显微镜观察，初步定为松乳菇），通过对松乳菇子实体以及组织分离株的 rDNA ITS 区序列进行扩增、测序及分析，鉴别出组织分离株就是松乳菇的纯菌种。

1　材料与方法

1.1　菇体及菌株

2004 年 4 月 1 日、2004 年 11 月 27 日以及 2005 年 4 月 10 日在江西省吉安县进行调查、采集松乳菇子实体，分别对松乳菇进行组织分离得到相同形态的菌丝。待鉴定

* 江西省重点科技计划项目（No. Z2100）

** 通讯作者　Tel：0791-8327271，E-mail：xiaoman20032008@yahoo.com.cn

收稿日期：2005-08-30，**修回日期**：2006-02-20

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

菌株和松乳菇子实体分别用OTU1和OTU2表示（OTU即operational taxonomic unit）。

1.2 方法

1.2.1 菇体及菌丝体的DNA提取：取0.2 g子实体或离心收集液体培养的新鲜菌丝体，在1.5 mL的Eppendorf管中用研杵充分研磨后加入600 μL 2× CTAB提取缓冲液（EDTA 20 mmol/L，Tris-HCl 100 mmol/L，pH 8.0，NaCl 0.7 mol/L，CTAB 20 g/L），65℃水浴30 min。加等体积氯仿、异戊醇混合液（V:V=24:1）充分摇匀，4℃下10,000 r/min离心10 min，转移上清液至新的1.5 mL的离心管中，加入等体积的苯酚、氯仿和异戊醇（V:V:V=25:24:1）。本步骤需重复多次，直至处于中间的蛋白质相消失为止。移取上清液至一新的Eppendorf管中，加入10%体积的3 mol/L NaAc溶液（pH 6.0）和2.5倍体积的冰冻乙醇，4℃下10,000 r/min离心5 min，沉淀用70%的酒精洗2~3次。晾干，加TE（含10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA pH 8.0）缓冲液充分溶解后在-20℃下保存备用。

1.2.2 ITS区段的PCR扩增：松乳菇子实体以及组织分离株rDNA ITS区域的扩增引物为ITS1-F（5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'）[5]，ITS4（5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'）[6]。PCR反应体系为DNA模板（50 ng~1 μg/μL）0.5 μL，10×buffer 5 μL，dNTPmix 4 μL，Taq酶1U（0.5 μL），ddH_2O 38 μL，总体积50 μL。PCR反应程序为：95℃预变性5 min，94℃变性1 min，55℃退火1 min，延伸72℃ 1 min，补平72℃ 5 min，共进行30个循环。

1.2.3 扩增产物测序：PCR产物纯化后直接测序（上海基康生物技术有限公司完成）。

1.2.4 产物序列分析：将测得的ITS序列在GenBank序列库中做BLAST，找出与之最大相似性的序列，下载相似序列的ITS区域，用Clustal W（BioEdit 7.0.0软件）进行序列比对（Multiple alignments），并辅以人工修正。分析时所用参数均为软件默认值。

1.2.5 系统树的构建用：TREECON for Windows（version 1.3b）进行系统（phylogenetic）分析。基于Kimura双参数模型，Neighbor-Joining法构建系统树，AJ534900（*Lactarius* sp. A54）为外类群（outgroup）。经bootstrap法1,000次循环检验系统树可靠性。

2 结果与分析

2.1 rDNA ITS区段PCR扩增及测序结果

rDNA ITS区段PCR扩增结果的电泳图见图1，OTU1和OTU2的长度在600bp左右。测序结果rDNA ITS区段长度分别为654bp和652bp，序列结果如下。

OTU1：

TTATCGTACAACGTGCGTGGAGGGCGTGCGAGGGCTGTCGCTGACTTTTTGTTGACGCA
AAAGTCGTGCACGCCCGAGCACGTCCTCTCGCATAAAATCCATCTCACCCTTTTGTGCA
CCACCGCGTGGGCACCTTTTGGGATCGAACCGATCCTGGAGGGGGCTTGCGTTTTCACA
CAAACCCCTTTTAAAAAAGTGTAGAATGACCCCATTTTGCGATGACACGCAATCAATAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
ACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCC
CTTGGTATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTCGTGAAATTCTCAACCTTCTCGGTTT

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

TCTTCTGGACACCGAAGGAGGCTTGGACATTGGAGGCCTTTGCTGGCGTCTCTTAGACC
CAGCTCCTCTTAAATGAATTAGCGGGGTCCTCTTTGCCGATCCTTGACATGTGATAAGAT
GTTTCCATGACTTGGTTTCTGGCTCTGTTGCATTTGGGACCTGCTTCTAACCGTCTCGAC
GAGACAACGTTTGGGCGTGTCTCCCTTCTCGGGAGACTCTCTCAACCCCACGAACCCTT
GA

OTU2：

ATATCGTACAACGTGCGTGGAGGGCGTGCGAGGGCTGTCGCTGACTTTTTGTTGACGCA
AAAGTCGTGCACGCCGGAGCACGTCCTCTCGCATAAAATCCATCTCACCCTTTTGTGCA
CCACCGCGTGGGCACCTTTTGGGATCGAACCGATCCTGGAGGGGGCTTGCGTTTTCACA
CAAACCCCCTTTAAAAAAGTGTAGAATGACCCCATTTTGCGATGACACGCAATCAATAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
ACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCC
CTTGGTATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTCGTGAAATTCTCAACCTTCTCGGTTT
TCTTCTGGACACCGAAGGAGGCTTGGACATTGGAGGCCTTTGCTGGCGTCTCTTAGACC
CAGCTCCTCTTAAATGAATTAGCGGGGTCCTCTTTGCCGATCCTTGACATGTGATAAGAT
GTTTCCATGACTTGGTTTCTGGCTCTGTTGCATTTGGGACCTGCTTCTAACCGTCTCGAC
GAGACAACGTTTGGGCGTGTCTCCCTTCTCGGGAGACTCTCTCAACCCCACG AACCCCT

2.2　rDNAITS 区段同源性检索

在 GenBank 核酸序列数据库中，进行 blastn 搜索，得到的同源序列全部是乳菇属不同的物种。下载上述相似物种中有代表性的 ITS 序列，用 Clustal W（BioEdit7.0.0 软件）进行序列比对，并辅以人工修正后。

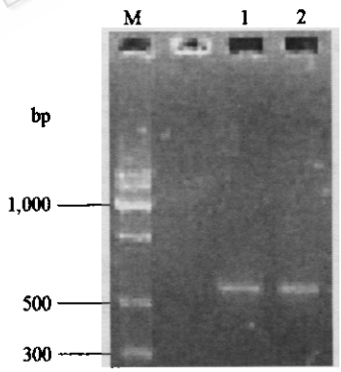

图 1　OTU1 和 OTU2 rDNAITS 区域的 PCR 产物

M Marker Ⅷ，1～2 OTU1 和 OTU2

基于松乳菇子实体、分离株以及来自 GenBank 的最相似乳菇属 22 个种的 ITS 序列，用 TREECON for Windows（version 1.3b）软件构建无根 NJ 系统树。分析序列采用 Kimura 双参数模型。AJ534900（*Lactarius* sp. A54）为外类群（outgroup），从中间生根（The tree is midpoint rooted）。图中只显示用百分数表示的大于 70% 的 Bootstrap 值。系统树见图 2。

从系统树可看出，乳菇属的不同种，种间、种内距离在宽度和重叠排列（wide and overlapping range）上都不同。OTU1 和 OTU2 与乳菇属中的松乳菇聚为一支。基于系统树其它部分的分支上物种（如 *Lactarius salmonicolor*、*Lactarius deterrimus* 等）种内距离，可以推断 OTU1 与乳菇属中的松乳菇为相同种，而且这种根据系统树规律鉴定种的方法也很好的符合一种标准。即 Taylor 等概述的用 PSR（Phylogenetic Species Recognition）来作为鉴定进化种（phylogenetic species）的标准之一[7]。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

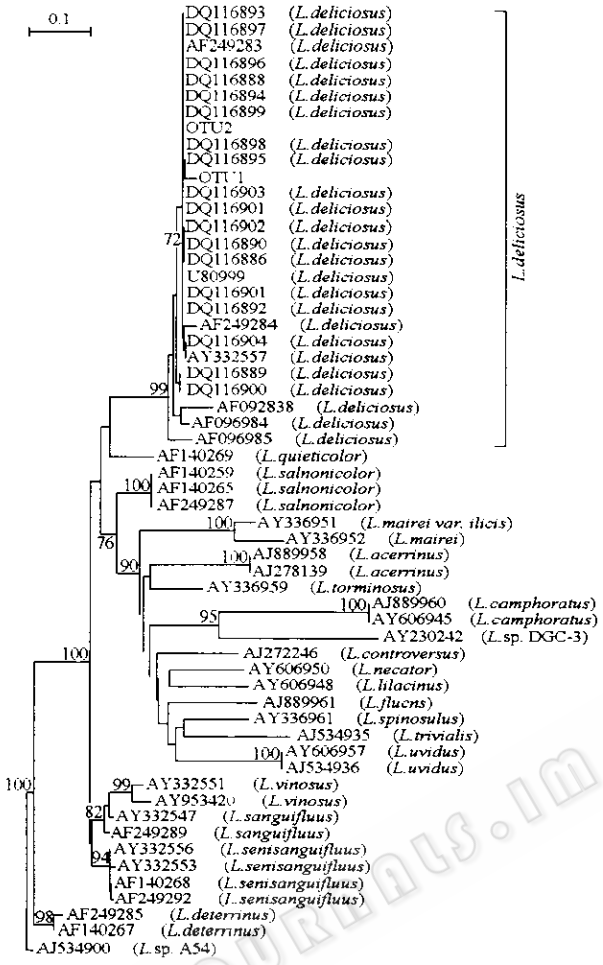

图2 基于子实体、分离菌株及来自 GenBank 的最相似物质的 ITS 序列构建的 NJ 系统发育树

3 讨论

尽管 rDNA ITS 区已被国际上公认是生物各类群属下种间、种内水平比较研究的一个很好的分子指标，并且已在动物[8]、被子植物[9]、真菌[10]等都已得到广泛的应用，但是，作为种的界定标准，目前尚未有一致的标准。Renske Landeweert 等认为通过 ITS 区域比对，序列相似性≥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≤95%，鉴别为相同科[3]。另外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) 方法对鉴定进化种更具有科学严谨性[7]。已有成功应用的报道[11]。当然也可以用其它一些分子生物技术如 PCR/RFLP[12,13,14]、PCR/RAPD[15]等对种群关系进行鉴定，作出更全面、更准确的判断。

参考文献

[1] Marco L, Francesco P, Andrea R, *et al*. FEMS Microbiology Letters, 2005, **243**: 411~416.
[2] Erzsébet J, Kovács G M, Agerer R, *et al*. Mycorrhiza, 2005, **15**: 247~258.
[3] Renske L, Paula L, Thomw K, *et al*. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69** (1): 327~333.
[4] Thomas R. Horton. Plant and Soil, 2002, **244**: 29~39.
[5] Gardes M, Bruns T D. Mol Ecol, 1993, **2**: 113~118.
[6] White T J, Bruns T, Lee S, *et al*. Academic Press, New York, 1990, 315~322.
[7] John W T, David J, Jacobson S K, *et al*. Fungal Genetics and Biology, 2000, **31**: 21~32.
[8] John T S, Rafael Z, Axel M, *et al*. Molecular Biology and Evolution, 1998, **15**: 798~808.
[9] Ainouche M L, Bayer R. Genome, 1997, **32**: 730~743.
[10] Eric S, Christiaan V, Jacqueline B. FEMS Microbiology Ecology, 2003, **45**: 49~57.
[11] Józsdf G, Donsld D D, David M G. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, **35**: 313~322.
[12] Gavin K. Mycorrhiza, 2001, **10**: 217~229.
[13] Luana B, Lucia P, Alessandra Z, *et al*. FEMS Microbiology Letters, 1998, **164**: 397~401.
[14] Gabriela M, Vetúria L O. Mycorrhiaz, 2003, **13**: 101~105.
[15] Bidochka M J, McDonald M A, St-Leger R J, *et al*. Current Genetics, 1994, **25**: 107~113.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn