

研究报告

中国香菇主栽品种遗传多样性的 SSR 分析及指纹图谱构建

董慧^{1,2} 章炉军¹ 张美彦¹ 姜宁^{1,2} 于海龙¹ 宋春艳¹ 尚晓冬¹ 谭琦^{1*}

(1. 上海市农业科学院食用菌研究所 国家食用菌工程技术研究中心 上海 201403)

(2. 上海海洋大学 上海 201306)

摘要:【目的】香菇(*Lentinula edodes*)是世界第二大食用菌,研究我国现有栽培种群体的遗传多样性和遗传构成以及准确鉴定品种是新品种开发和产业健康发展的基础。【方法】采用多态性的 SSR (Simple sequence repeat)分子标记对中国历年来使用主栽品种进行遗传多样性及群体结构分析,比较其谱系来源,解析中国主栽品种的群体多样性构成,并构建指纹图谱用于品种鉴定。【结果】24 对多态性 SSR 引物对 51 份香菇菌株都具有多态性。聚类分析在相似系数 0.69 处可将栽培种群体分为 4 个类群,野生种驯化或参与杂交获得的菌株位于类群 III 和 IV,其他菌株位于另外两个类群 I 和 II。群体结构分析可将栽培种群体分为 6 个遗传构成,显示 L808、L135 等代表性菌株在各自的构成中参与了其他菌株的选育过程,解释了以其为亲本的部分品种的谱系来源。依据筛选出的 9 对条带清晰的 SSR 引物组合构建了多位点 SSR 指纹图谱,可对 45 个香菇商业菌种进行辨识。【结论】我国香菇主栽品种亲缘关系较近,育种多围绕 L808、L135、9015 等核心代表性品种进行,本研究可为选育具有自主知识产权、适应不同栽培模式的新品种提供依据;指纹图谱的构建也能为香菇品种的准确鉴定提供保证。

关键词: 微卫星序列, 群体遗传结构, 品种谱系

Genetic diversity and fingerprint profiles of Chinese major *Lentinula edodes* cultivars based on SSR markers

DONG Hui^{1,2} ZHANG Lu-Jun¹ ZHANG Mei-Yan¹ JIANG Ning^{1,2} YU Hai-Long¹
SONG Chun-Yan¹ SHANG Xiao-Dong¹ TAN Qi^{1*}

(1. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, National Research Center of Edible Fungi Biotechnology and Engineering, Shanghai 201403, China)

(2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: [Objective] Xianggu (*Lentinula edodes*) is the second biggest edible fungi in the world. Genetic diversity and population structure analysis and reliable identification of strains are prerequisites for new cultivar breeding and the sustainable development of Xianggu mushroom

Foundation item: Key Technologies R&D Program of China (No. 2013BAD16B02); Foundation of Shanghai Seed Industry Development (No. 2014-10 SAAS)

*Corresponding author: Fax: 86-21-62209760; E-mail: syj0@saas.sh.cn

Received: March 20, 2016; Accepted: May 16, 2016

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2013BAD16B02); 上海种业专项(No. 2014-10 SAAS)

*通讯作者: Fax: 86-21-62209760; E-mail: syj0@saas.sh.cn

收稿日期: 2016-03-20; 接受日期: 2016-05-16

industry. **[Methods]** Using polymorphic SSR markers to analysis the genetic diversity and population structure of the major cultivars in China, comparing their genetic pedigree and constructing the fingerprint profiles that can be used for varietal identification. **[Results]** In this study, 51 strains were identified with SSR markers including 24 pairs of primers and their polymorphism was 100%. According to the clustering analysis, experimental population could be divided into four clusters at the similarity of 0.69. Wild strains or cultivars derived from wild strains in cluster III and IV, and other hybrid cultivars in cluster I and II. The cultivar population can be divided into 6 genetics compositions according to the population structure analysis. Showing that several core strains are involved in others' breeding procedure such as L808、L135, and can explain the pedigree of the cultivars used them as parents. 9SSR primer pairs delineated 45 of the cultivars based on the unique multilocus SSR fingerprint profiles. **[Conclusion]** The results indicated a close genetic relationship of cultivars in China, and the breeding research was always focus on several core strains such as L808、L135、9015. This research offered some references to the genetic breeding that has our own intellectual property and can adjust different cultivation mode. The fingerprint profiles could also provide safeguards for the reliable identification of Xianggu strains.

Keywords: Simple sequence repeat, Population genetic structure, Breed pedigree

香菇(*Lentinula edodes*)是世界第二大食用菌^[1],也是我国特产之一,在民间素有“山珍”之称,具有很高的食药用价值。自1989年起我国已是世界上最大的香菇生产和出口国,香菇产量达世界总产量的80%左右^[2]。随着产销量的增加,香菇栽培和育种等工作受到人们的高度重视。香菇品种是香菇产业发展的基础,直接决定着香菇的产量和质量,关系到整个产业的可持续发展。目前我国优异香菇栽培品种不足,许多老产区多年使用同一品种,并且随着香菇工厂化栽培的起步,市场对不同类型香菇新品种的需求不断增加。另外,香菇菌种市场长期存在菌种杂乱的现象,菌种质量得不到保证,损害了育种者的积极性和菇农的利益。因此,对我国目前所有主栽品种进行遗传多样性分析,构建DNA指纹图谱,可为香菇栽培品种的准确鉴定和新品种选育提供参考依据。

已有的用于香菇品种鉴定的分子标记有RAPD(Random amplified polymorphic DNA)^[3]、AFLP(Amplified fragment length polymorphism)^[4]、ISSR(Inter-simple sequence repeat)^[5]和SCAR(Sequence characterized amplified regions)^[6-8]等,这些标记各有优劣,RAPD、AFLP和ISSR扩增得到的条带较多,统计分析比较复杂^[9],SCAR标记由于受基因组序

列信息的限制,目前可利用的标记数量较少。SSR标记是基于全基因组测序技术发展起来的新一代分子标记,具有数量多、分布均匀、多态性信息丰富、易于检测和共显性标记等优点,已作为优良的遗传标记被应用到遗传连锁图谱构建、遗传多样性分析、分子生态学和进化学等研究领域^[10-13]。

本研究以51个香菇菌株为实验材料,包括国内各地主要栽培品种、少量野生菌株及国外栽培品种。利用多态性的SSR分子标记进行基因型鉴定,通过基因型数据进行遗传多样性分析、群体结构分析,并建立各品种特异性的SSR指纹图谱,以期促进香菇新品种选育以及品种保护并推动良种良用,纯化菌种市场。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及其培养

收集我国历年所用的47个香菇主栽品种,其中25个菌株是经国家品种委员会认定的香菇商业栽培品种(表1),22个非认定菌株收集自全国各地的香菇栽培主产区。菌株YH1-3和0317为从中国四川和陕西采集的两株野生菌株,菌株JW-1和JDX1020别为收集自日本的代料和段木栽培品种,以上4个菌株作为对照。菌株来源及谱系的详细信息见表2。将4℃保藏的供试香菇菌株转接到PDB

表 1 通过国家审定的香菇栽培品种
Table 1 Authorized cultivars of *Lentinula edodes* in China

菌株名称 Cultivar name	认定编号 Identified No.	菌种来源 Source	谱系 Pedigree
Shenxiang-8	2007001	上海 Shanghai	野生种 70 与苏香单孢杂交
Shenxiang-10	2007002		菌株 L26 与苏香非对称杂交
Shenxiang-12	2007003		野生种 69 与苏香非对称杂交
Cr02	2007004	福建省 Fujian	菌株 7402 与野生种 Lc01 单孢杂交
L135	2007005		国外引进菌株系统选育
Minfeng-1	2007006		菌株 L12 与当地种 L34 单孢杂交
Cr62	2007007		菌株 7919 与当地种 L21 单孢杂交
Cr04	2007008		菌株 7917 与当地种 L21 单孢杂交
L9015	2007009	浙江省 Zhejiang	241, 8210, 日丰 34 段木分离
241-4	2007010		菌株 241 系统选育
Wuxiang-1	2007011		国外引进菌株系统选育获得
Ganxiang-1	2007012		菌株 1303 与 H03 单孢杂交
Junxing-8	2008007		野生种驯化
L9319	2008008		农户处分离获得
L808	2008009		农户处分离获得
Jindi	2007013	四川省 Sichuan	菌株 939 与 L135 原生质体杂交
Senyuan-1	2007014	湖北省 Hubei	菌株 8404 与 856 单孢杂交
Senyuan-10	2007015		菌株 8404 与 L135 单孢杂交
Senyuan8404	2007016		野生种驯化
Huaxiang-8	2008004		农户处分离获得
Huaxiang-5	2008005		国外引进菌株系统选育获得
L952	2008006		国外引进菌株系统选育获得
Xiang-9	2008001	广东省 Guangdong	野生种驯化
Xiangza-26	2008002		野生种 8 与 40 杂交选育
Guangxiang-51	2008003		野生种驯化

液体培养基(200 g 土豆、20 g 葡萄糖、1 L 水)中, 每瓶接 10 块 0.25 cm² 大小的菌块, 25 °C、120 r/min 避光振荡培养 10 d 左右, 过滤收集菌丝球, 用吸水纸吸干菌丝球中的培养基, 放入-20 °C 冰箱冷藏备用。

1.2 主要试剂和仪器:

CTAB 粉末等 DNA 提取试剂以及聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂均为生工生物工程(上海)股份有限公司产品; *Taq* 聚合酶购自 Promega 公司; dNTPs 购自上海天根生物有限公司。其它生化试剂均为进口或国产分析纯级试剂。NanoDrop 1000 型分光光度计、2720 Thermal Cycler 型 PCR 扩增仪购自美

国 Thermo Fisher 公司; PYCZ-20E 型电泳仪购北京市六一仪器厂。

1.3 DNA 提取及 PCR 扩增

本研究采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[14]。使用分光光度计对提取的 DNA 进行浓度和纯度检测。将提取的 DNA 溶液用双蒸水稀释至 0.1 g/L, 储存于-20 °C 备用。

PCR 反应体系(10 μL): 10×Reaction buffer (不含 Mg²⁺) 1 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1 μL, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 0.2 μL, *Taq* 聚合酶(5 U/μL) 0.1 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 4.7 μL。

表 2 非国审香菇主栽品种信息
Table 2 Other tested major cultivars of *Lentinula edodes* in China

菌株名称 Cultivar name	谱系 Pedigree	来源 Source
Suxiang-1	未知	上海农科院食用菌研究所
3176	国外引进菌株	上海农科院食用菌研究所
7402	国外引进菌株	上海农科院食用菌研究所
Shenxiang-15	未知, 液氮保藏菌株筛选获得	上海农科院食用菌研究所
Shenxiang-16	939×L135 原生质体杂交	上海农科院食用菌研究所
Shenxiang-18	申香 15×939 非对称杂交	上海农科院食用菌研究所
Pingquan 18	系统选育	河北平泉
Q1	未知	河北平泉
L26	国外引进菌株系统选育获得	福建三明真菌研究所
9608	9015 或 939 系统选育成	河南西峡食用菌科研中心
931	未知	浙江丽水市大山菇业
J868	未知	浙江丽水市大山菇业
Qingke-20	L9015 自然突变菌株	浙江省庆元县食用菌研究中心
939	人工选育	浙江省庆元县食用菌研究中心
Shouxiang-1	未知	浙江寿仙谷
Zhexiang-6	未知	浙江农科院园艺研究所
Xiangru	未知	台湾高昌
YH1-3	野生种	四川省野生菌株
0317	野生种	陕西省野生菌株
JDX1020	日本椴木种	日本
JW-1	日本栽培种	日本
B2	工厂化用种	山东七河生物
B10	工厂化用种	山东七河生物
N5	工厂化用种	山东七河生物
N6	工厂化用种	山东七河生物
N7	工厂化用种	山东七河生物

PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。

1.4 SSR 引物筛选

参照 Zhang 等^[15]的实验结果, 选取亲缘关系相近的 6 个国审认定菌株(L9015、L808、Wuxiang-1、Cr04、Xiangza-26 和 Junxing-8)和一株遗传背景差异较大的菌株 Shenxiang-16, 以及一株野生菌株 YH1-3 共计 8 个菌株对香菇全基因组序列开发的 340 对 SSR 引物进行了筛选, 从中选取具有多态性

的引物对。

1.5 基因型数据统计分析

统计 SSR 扩增条带, 在相同迁移位置上, 有条带样品记为“1”, 没有条带则记为“0”, 缺失数据记为“2”。用 PowerMarker V3.25^[16]按 $PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$ 计算每对引物的 PIC (Polymorphism information content, 多态性信息量)值统计 SSR 引物的多态性信息。

1.6 UPGMA 聚类分析

将条带信息中 0、1 和 2 数据分别转换成碱基 A、

T 和 N, 然后利用比对软件 ClustalX 2.1^[17]进行多序列比对, 将比对结果进行 UPGMA 方法聚类^[18], 最后用 NTSYS 2.10 软件建树, 根据菌株间的遗传相似系数构建香菇主栽品种的聚类图。

1.7 群体结构分析

将 SSR 扩增结果转换成等位位点数据, 利用 Structure 2.3.4^[19]软件进行群体结构分析, K 值为假定的群体中存在的遗传结构群的数量, 将 K 值设置为 1-12 进行运算, 将“Length of Burnin Period”值设为 10 000, 再将不作数迭代后的 MCMC 值设为 100 000, 每个 K 值独立运算 20 次, 然后将获得的 K 值计算其 $\Delta K = (M[L(K+1) - 2L(K) + L(K-1)]) / S[L(K)]$, 对应 ΔK 值最大的 K 值即可认为是该群体中遗传结构群的数量。选择相对应 K 值的群体结构柱状图, 进行群体结构分析。

1.8 指纹图谱构建

选择 SSR 标记扩增结果中可将主栽品种尽可能区分开的引物组合, 根据不同菌株间这些引物组合扩增条带的差异构建指纹图谱。该引物组合显示某个菌株扩增的条带类型为该菌株特有, 在群体中为唯一的组合形式, 即认为获得了该菌株的指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物选择

在使用 8 个菌株的选择群体进行 SSR 引物筛选后, 获得了 7 对在选择群体具有多态性的 SSR 引物, 参考并选用 Zhang 等^[15]和叶翔等^[20]研究中所采用的 17 对 SSR 引物, 共计 24 对 SSR 引物(表 3)作为本实验检测的所有 SSR 位点。

表 3 本文所用 SSR 引物信息
Table 3 The 24 SSR primer pairs used in this study

引物名称 Primer name	重复基序 Repeat motifs	引物序列 Primer sequence (5'→3')
43	(ATGGTG)	CTCTTTGCACCCTCAACCTCCAGCAGTCTCCTCTTGGCTC
76	(GA)	AAGCAGGTCAGAGCAGGTTACCGAGAGCAGAGTCGAGAG
44-1	(CAC)	CGCATTGAGCTCCAAAACTAGGAGGAGAAGGAGGTCGAG
148-1	(CTC)	CATTGCTCGGATCCTTCATTTACCTCGTGCGGACTTTGAT
1140	(AGGT)	CCCAAAAAGGATTTAGCAAAAACCGGAGTGGTGTAAAGTGC
192-1	(CT)	ACGCGTATCCTCCCCTAAGTAAGCGATATGGATTTGACGC
14-2	(CT)	ATTGTGACTCGACCACCTCCTCATAATGCATCCCGTGAGA
S1 ^[20]	(TC) ₇ IGTCTT(TG) ₅	CTTATTTAGTGCCTAGATGGTTTCGCTGGACTCGTCGAT
S4 ^[20]	(CT)	TTGTTTCGTTCTCGCTCTAAGCAATTTCTCGCAGCAGTT
S13 ^[20]	(GGAT)	ACTTCCCTTTCTTCTCGTATGTATGTTTCGCCTTTAT
S15 ^[20]	(TAG)	ATTTCCCTCACCTGGCTCAGCATCCCAATTTGCTACA
S16 ^[20]	(AG)	ATAGGATGATTGAACGAGCAGACCGTAAGGTGGGAAGAAA
S19 ^[20]	(TCC)	ATGCCGTTCCAAAGATACTTGAAGCCTGACAGAGTG
S23 ^[20]	(AT) ₃ N ₉ (AT) ₃	TCTGTAACGCTTGTGGACTATTCTGAATGTACCCAATCTC
S26 ^[20]	(TA) ₃ N ₃₁ (TCA) ₃	TTATCATTGTCGGAAGGGCAGGGTTGTAGAAGAAGGTTGG
S30 ^[20]	(CAGT) ₃ N ₁₂	CTCTTGCAGGACTTATGTAAGTACCAAACTGTTGT
A8 ^[21]	(GAG) ₃ N ₇ (TGG) ₃	TCATCTCCTTCCCATGTTCCCAATACCGGTAACACGTC
X7 ^[22]	(ACTTG)	TTATAGGCCCGGCCCACTTTTCGCCGGGGTATCGTATTGG
Le-fp01 ^[15]	(CT)	ACGCGTATCCTCCCCTAAGTAAGCGATATGGATTTGACGC
Le-fp02 ^[15]	(CGAC)	GGGCGAAACAATTTAGGTAATGCCATCGTAAGGAAGTTCG
Le-fp03 ^[15]	(CT)	ATTGTGACTCGACCACCTCCTCATAATGCATCCCGTGAGA
Le-fp05 ^[15]	(TAC)	CATCAACCAACCAAGATTCAATTTCCAATTTCTCCGAGTCA
Le-fp06 ^[15]	(TCA)	CATGGGAGAGATTCGAAAAACGAGACCGACGACTTTGACT
Le-fp07 ^[15]	(CTC)	CATTGCTCGGATCCTTCATTTACCTCGTGCGGACTTTGAT

2.2 SSR 基因型多态性信息

24 对引物对全部供试材料进行扩增及电泳检测,共检测到 80 个多态性条带,引物多态性比率为 100%。其中每对 SSR 引物扩增出的等位基因数为 2-7 个,平均 3.3 个,等位基因频率在 0.398 0-0.931 4 之间。基因型数最少为 2 个,最多为 12 个,平均基因型数为 4.9 个。多态性信息量变化范围为 0.124 9-0.638 8,平均 0.400 4。表 4 显示 SSR 扩增的遗传学信息。

2.3 遗传多样性结果

UPGMA 聚类分析结果显示(图 1),在遗传相似系数为 0.69 处可将 51 个香菇菌株分为四大类,其

中 I 类和 II 类为栽培种,III 类和 IV 类为野生种以及经野生种驯化或杂交获得的栽培品种。第 I 类包含了 32 个栽培品种;第 II 类 16 个栽培品种;第 III 类包含了 2 个菌株,野生种 0317 和从野生种驯化获得的栽培种 Xiang-9;第 IV 类只有一个菌株,为野生种 YH1-3。其中第 II 类群菌株中部分为早期引进的国外段木栽培品种,如 JDX1020、JW-1 和 7402,由于其与野生种之间的相似系数较高,可推测早期引进的国外品种具有野生种遗传背景。

在本试验的 51 个菌株中,国审品种 Shenxiang-10、Shenxiang-12 和 Wuxiang-1 间的遗传相似系数为 1,不能区分;栽培品种 931、Pingquan-18

表 4 SSR 标记的遗传学参数信息

Table 4 The genetic parameters of SSR markers for cultivars of *Lentinula edodes*

引物 Primer	基因型数 Genotype No.	等位基因数 Allele No.	等位基因频率 Major allele frequency	基因多样性 Gene diversity	表观杂合度 Heterozygosity	PIC 值 PIC
S1	6	4	0.470 6	0.632 6	0.823 5	0.560 3
S4	4	3	0.931 4	0.129 8	0.019 6	0.124 9
S13	2	2	0.765 3	0.359 2	0.469 4	0.294 7
S15	5	3	0.803 9	0.325 1	0.313 7	0.288 0
S16	5	3	0.670 0	0.465 4	0.180 0	0.388 2
S19	5	3	0.852 9	0.257 8	0.215 7	0.236 4
S23	3	2	0.696 1	0.423 1	0.490 2	0.333 6
X7	5	4	0.588 2	0.533 4	0.745 1	0.449 4
S26	4	3	0.676 5	0.449 6	0.529 4	0.364 7
S30	7	6	0.710 0	0.446 0	0.160 0	0.395 5
A8	7	4	0.398 0	0.663 3	0.367 3	0.593 8
14-2	2	2	0.754 9	0.370 0	0.490 2	0.301 6
192-1	4	3	0.622 4	0.477 5	0.510 2	0.372 8
1140	3	2	0.523 3	0.498 9	0.488 4	0.374 5
76	3	2	0.637 3	0.462 3	0.529 4	0.355 5
43	8	6	0.480 4	0.682 6	0.745 1	0.638 8
148-1	6	4	0.450 0	0.595 4	0.660 0	0.510 3
44-1	5	3	0.591 8	0.565 6	0.693 9	0.503 3
Le-fp01	3	2	0.676 5	0.437 7	0.451 0	0.341 9
Le-fp02	8	4	0.539 2	0.598 8	0.588 2	0.532 2
Le-fp03	2	2	0.754 9	0.370 0	0.490 2	0.301 6
Le-fp05	12	7	0.560 0	0.631 6	0.400 0	0.595 5
Le-fp06	3	2	0.696 1	0.423 1	0.529 4	0.333 6
Le-fp07	5	4	0.532 6	0.526 7	0.478 3	0.418 9
平均值 Mean	4.9	3.3	0.640 9	0.471 9	0.473 7	0.400 4

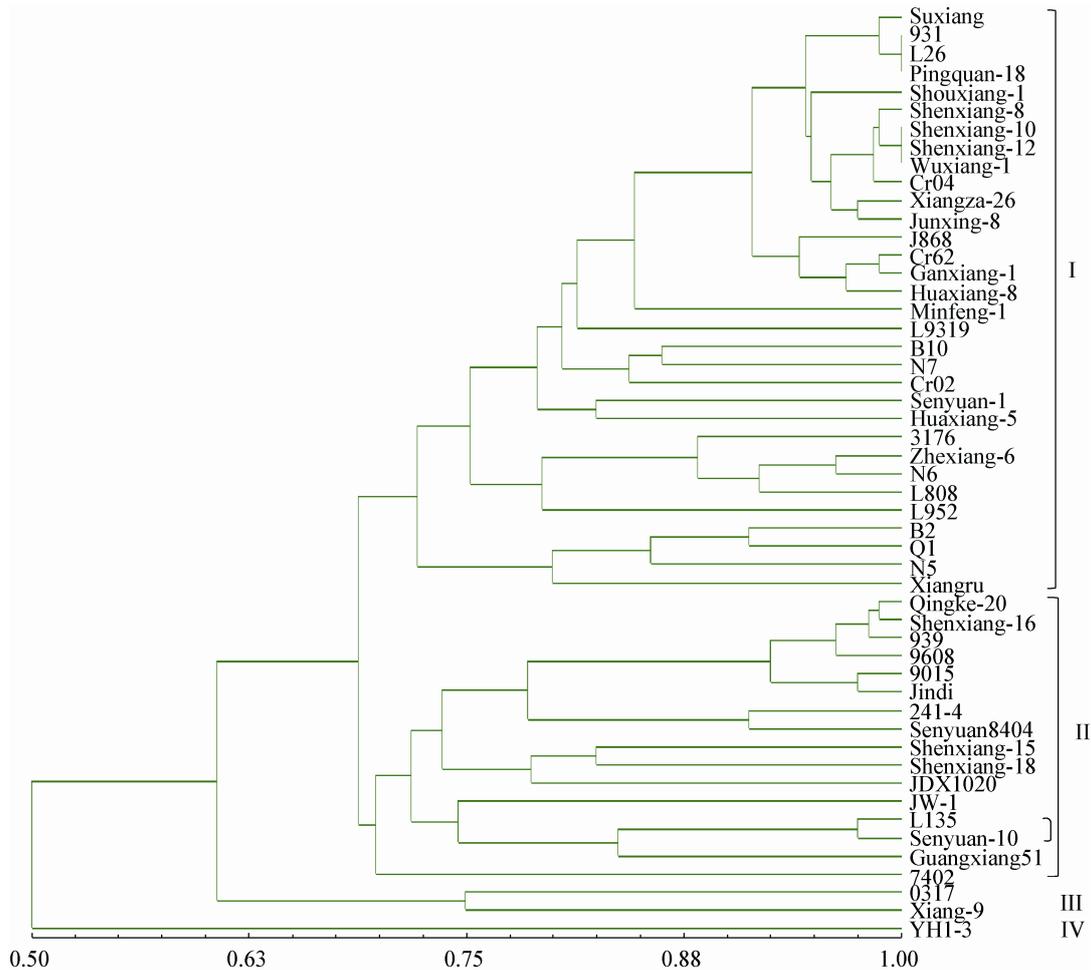


图 1 我国香菇主栽品种 UPGMA 聚类分析

Figure 1 UPGMA cluster based on SSR markers for major cultivars of *Lentinula edodes* in China

和 L26 也无差异; 其他供试品种都可区分开。遗传多样性分析结果表明, 现有商业菌种部分材料之间遗传背景的相似性非常高, 除了野生品种 YH1-3、0317 及野生驯化品种 Xiang-9, 其他菌株之间的遗传相似系数大都在 0.60 以上。其中 Shenxiang-10 和 Shenxiang-12 均是以苏香为亲本杂交得到的: Shenxiang-10 为菌株 L26 与 Suxiang 非对称杂交, Shenxiang-12 号为野生种 69 与 Suxiang 非对称杂交。由于是非对称杂交, 这两个品种本身有差异, 但差异可能来自 Suxiang 外的另一亲本, 即可能是胞质遗传物质, 而这部分差异可能较难用 SSR 来区分, 该结果与之前 Zhang 等^[15]、叶翔等^[20]所得鉴定结果一致。另外部分菌株无法区分可能与本研究使

用的引物有关, 选择的 24 对 SSR 引物虽然多态性比率较高, 但 PIC 值较低, 如引物 S4 的 PIC 值仅为 0.104 6, 多态信息量不高。

2.4 群体结构分析

根据 Structure 软件获得的 K 值计算的 ΔK 值在 $K=6$ 时最大, 所以可将栽培群体分为 6 个遗传结构亚群(图 2)。这 6 个亚群所包含的菌株可与 UPGMA 聚类分析的不同类群相对应, III 类和 IV 类菌株都集中于蓝色亚群, 可推测具有蓝色遗传构成的菌株含有野生种遗传构成或由野生种参与育种获得。类群 I 中包括了除黄色和浅蓝色图示以外的大部分遗传结构亚群, 其中红色亚群中包括的菌株最多, 也是遗传相似系数最高的一部分菌株; 绿色亚群具有

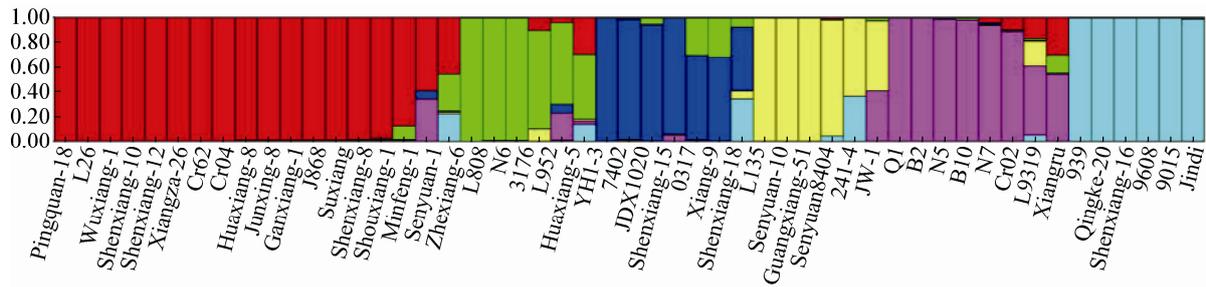


图2 我国香菇主栽品种群体结构组成

Figure 2 Genetic structure constitution of major cultivars of *Lentinula edodes* in China

注：6种不同的颜色柱状图显示6种遗传构成在某个菌株中所占的比例。

Note: The 6 histograms with different colors showed the proportion of genetic structure constitution in one strain.

代表性菌株 L808，其余菌株均为与 L808 相似性很高的菌株，或者采用 L808 进行选育或杂交的菌株；紫色亚群中的菌株从谱系来源来看大多为工厂化用种，并与从日本引进的菌株 JW-1 有部分相同的遗传构成，但紫色亚群在聚类分析中分成了两部分，可推测该遗传构成在育种中参与并引入到了多个谱系的育种中。类群 II 可分为黄色和浅蓝色两个遗传构成，其中黄色部分有代表菌株 L135，该亚群菌株都含有 L135 的遗传构成；浅蓝色亚群则具有代表菌株 9015，其余菌株都与 9015 具有极高的遗传相似系数。

2.5 SSR 指纹图谱的构建

在遗传相似系数为 0.99 处，可将供试材料分为 47 个具有遗传差异性的类群。从所使用的 24 对引物中筛选出 9 对能够鉴定这 47 个类群的 SSR 引物：1140、76、43、148-1、44-1、S16、S19、Le-fp02、192-1。根据所用的 SSR 引物参数信息可知，引物 Le-fp05 基因型数和等位基因数都较高，但由于其对遗传相似系数近的菌株区分度不高，在指纹图谱的构建中未被选用。虽然所有菌株都有引物 S19 的等位基因 2，但只有该引物能区分菌株 Shenxiang-16 与 Qingke-20，所以该引物被选择用于指纹图谱的构建。经过统计，Shenxiang-10、Shenxiang-12、Wuxiang-1 具有同一种基因型，931、Pingquan-18 和 L26 具有同一种基因型，其余 45 个菌种都有各自特异的基因型。

基于 51 个香菇菌种的 9 位点 SSR 基因型，构

建了 45 个具有特异基因型的香菇菌种的多位点 SSR 指纹图谱，将指纹图谱条带从大到小标号后以数字形式表示(表 5)，其中 DNA mix 由 Q1、7402、YH1-3、Xiangru、0317 和 JW-1 等 6 个菌株的 DNA 混合而成，用于指示指纹图谱中引物组扩增的所有条带的位置。

3 结论与讨论

本文的研究对象是中国香菇历年的主要栽培品种，遗传多样性分析和群体结构分析能够梳理这些品种间的遗传关系以及种质结构构成，为新品种的开发提供依据。另外，在聚类分析和群体结构分析中，某些具有相同表型或栽培类型的菌株处于同一类群，比如历年来使用过的高温型菌株相似性较高，工厂化栽培用种也处于同一聚类分支，或许这些菌株本来就是系出同源，也有可能是所用的分子标记位于某些重要表型或位点的编码区域，这些结果也可以为关联分析和 QTL (Quantitative Trait Locus，数量性状定位)提供一定的参考。

本研究未能将所有供试菌株全部区分开，可能是因为菌株本身就具有极高的相似性，如 Shenxiang-10、Shenxiang-12 遗传相似性系数为 1，可能由于这两个品种都是以 Suxiang 为亲本非对称杂交得到，品种之间的差异可能来自 Suxiang 外的另一亲本。另外本文所用的部分引物 PIC 值较低，多态性信息量不高也可能是本研究未能将供试材料全部区分的原因。除了对国审品种的区分外，本文还鉴定出区别于国审品种的 23 个香菇品种，并

表 5 基于 9 对 SSR 引物的供试香菇菌株指纹图谱
Table 5 Fingerprinting of tested strains based on 8 SSR primer pairs

菌株名称 Cultivar name	引物名称 Primer name								
	1140	76	43	148-1	44-1	S16	S19	Le-fp02	192-1
DNA mix	1/2	1/2	1/2/3/4/5/6	1/2/3/4	1/2/3	1/2/3	1/2/3	1/2/3/4	1/2/3
Suxiang	1/2	1/2	3/5	1/4	1/3	1	2/3	1	1/3
J868	1/2	2	3/5	1/4	1	1	2	1	1
3176	2	1/2	3/5	1/4	3	1	2/3	1	1/3
Qing-20	1	2	1/3	4	2/3	1	2	1	1
Shenxiang-16	1	2	1/3	4	2/3	1	2/3	1	1
JW-1	2	1	1/5/6	1/4	3	1	1/2/3	1	3
Shenxiang-15	0	1	3	2/4	3	2	2	1	1
JDX1020	0	1	3	2/4	2	1	2	1/4	1/3
0317	0	2	3	1	3	2/3	2	3	1/3
Shenxiang-18	0	1/2	3	4	2/3	2	2	1	1
YH1-3	0	1/2	3	3	0	2	3	3	1
7402	0	1/2	2	2	2	1	2	1/2	1/3
939	1	2	1/3	4	2/3	1	2/3	1/4	1
9608	1	2	1/3	4	2/3	1/2	2/3	1/4	1
B2	2	1	4/6	1/2	2/3	1	2	4	3
B10	2	2	1/3	1/2	1/2/3	1/2	2	1/2	1/2
Q1	1/2	1	1/3/4/6	1/2	2/3	1/2	2	4	3
Xiangru	1/2	1/2	3/4/6	1	1/2/3	1	1/2	1/4	1/3
Shouxiang-1	1/2	1/2	3/5	1/4	1/3	1	2	1/4	1/3
Zhexiang-6	2	2	1/3	1	3	1/2	2	1/4	1/3
N5	1/2	2	3/5	1/2	2/3	1	2/3	4	3
N6	2	2	1/3	1	3	1	2/3	1/4	1/3
N7	1/2	1/2	3	1/2	0	1	2/3	1/2	1
Shenxiang-8	1/2	1/2	3/5	1/4	1/3	1	2	1/4	1/3
Cr04	1/2	1/2	3	1/4	1/3	1	2	1/4	1/3
Cr62	1/2	2	3/5	1/4	1/3	1/2	2	1/4	1/3
Ganxiang-8	1/2	2	3/5	1/4	1/3	1/2	2	1/4	1
Senyuan-1	1	2	5	1/4	3	1	2	2/4	1
Xiangza26	1/2	1/2	3/5	1/4	1/3	1/2	2	1/3	1/3
Huaxiang-8	1/2	2	3/5	1/4	1/3	1	2	1/4	1
Cr02	2	2	3	1/2	1/3	2	2	1/2/4	1
Junxing-8	1/2	1/2	3	1/4	1/3	2	2	1/4	1/3
L9319	1	1/2	1/3	1/4	3	2	2	1	0
Minfeng-1	2	1/2	3/5	1/4	1/3	1	2	1/4	1/3
L135	1	1/2	3/5	1/4	2/3	2	2	1	3
Senyuan-10	1	1/2	3/5	1/4	2/3	2	2	1	3
Guangxiang-51	0	1/2	1/5/6	1/4	2/3	2	2	1/3	1/3
241-4	1	2	1/5/6	4	3	2	2	3/4	1
Senyuan8404	1	1/2	1/5/6	4	3	1	2	3/4	1/3
L9015	1	2	1/3	4	2/3	1	2	1/4	1
Jindi	1	2	1/3	4	2/3	2	2	1/4	1
Huaxiang-5	1/2	1/2	5	1	2/3	1	1/2/3	1/4	1
L952	2	1/2	3/5	1/2	1/3	2/3	2	1/4	1
L808	2	1/2	1/3	1	3	1	2	4	1/3
Xiang-9	0	2	4	1	3	3	2	3	0

基于 9 个 SSR 标记构建出 45 个具有特异基因型香菇菌种的多位点 SSR 指纹图谱。

近几年,国内外采用 ITS、ISSR、RAPD、SCAR 等标记分析香菇品种遗传多样性并建立鉴定系统的研究时有报道,但这些分子标记存在条带复杂、重复性、稳定性不高等缺点,而 SSR 标记条带简单稳定,成为香菇遗传背景分析、菌株鉴定的新宠^[11]。现文献中记载的 SSR 引物较少,且大部分为 EST-SSR、引物数量少。本研究使用了大量基于全基因组序列的 SSR 标记,在基因组上分布更广泛、更均匀,可以作为香菇种质资源评估、遗传背景分析、菌株鉴定的优良工具,更能揭示中国香菇栽培品种的遗传背景。另外,本研究开发的 SSR 指纹图谱不仅对供试菌株的分类具有参考价值,还可以用于今后的香菇品种鉴定中,对解决香菇生产上的品种混乱问题有重要价值。

参 考 文 献

- [1] Zhang ST, Miles PG. Historical record of the early cultivation of *Lentinus* in China[J]. Zhejiang Shiyongjun, 2010, 18(5): 40-43 (in Chinese)
张树庭, Miles PG. 关于中国香菇早期栽培的历史记载[J]. 浙江食用菌, 2010, 18(5): 40-43
- [2] Lin FC, Wang ZW, Yang XM. Cultivation of the black oak mushroom *Lentinula edodes* in China[A]//van Grienssen LJLD. Science and Cultivation of Edible Fungi[M]. Rotterdam: Balkema Publishers, 2000: 955-958
- [3] Zhang YF, Molina FI. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 131(1): 17-20
- [4] Lo TCT, Kang MW, Wang BC, et al. Glycosyl linkage characteristics and classifications of exo-polysaccharides of some regionally different strains of *Lentinula edodes* by amplified fragment length polymorphism assay and cluster analysis[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 592(2): 146-153
- [5] Zhang RY, Huang CY, Zheng SY, et al. Strain-typing of *Lentinula edodes* in China with inter simple sequence repeat markers[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(1): 140-145
- [6] Wu XQ, Li HB, Zhao WW, et al. SCAR makers and multiplex PCR-based rapid molecular typing of *Lentinula edodes* strains[J]. Current Microbiology, 2010, 61(5): 381-389
- [7] Li HB, Wu XQ, Peng HZ, et al. New available SCAR markers: potentially useful in distinguishing a commercial strain of the superior type from other strains of *Lentinula edodes* in China[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(2): 303-309
- [8] Qin LH, Tan Q, Chen MJ, et al. Use of intersimple sequence repeats markers to develop strain-specific SCAR markers for *Lentinula edodes*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 257(1): 112-116
- [9] Liu JY, Ying ZH, Liu F, et al. Evaluation of the use of SCAR markers for screening genetic diversity of *Lentinula edodes* strains[J]. Current Microbiology, 2012, 64(4): 317-325
- [10] Kaye C, Milazzo J, Rozenfeld S, et al. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map[J]. Fungal Genetics and Biology, 2003, 40(3): 207-214
- [11] Jany JL, Bousquet J, Gagné A, et al. Simple sequence repeat (SSR) markers in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for environmental monitoring of introduced strains and molecular ecology applications[J]. Mycological Research, 2006, 110(1): 51-59
- [12] Roy M, Dubois MP, Proffit M, et al. Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* is an actual multihost symbiont[J]. Molecular Ecology, 2008, 17(12): 2825-2838
- [13] Fisher MC, Koenig G, White TJ, et al. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(8): 1164-1174
- [14] Kuhad RC, Kapoor RK, Lal R. Improving the yield and quality of DNA isolated from white-rot fungi[J]. Folia Microbiologica, 2004, 49(2): 112-116
- [15] Zhang D, Song CY, Zhang LJ, et al. Genetic diversity and fingerprint profiles of commercial *Lentinula edodes* cultivars Based on SSR markers developed from the whole genome sequence[J]. Acta Edulis Fungi, 2014, 21(2): 9-13
- [16] Liu KJ, Muse S. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis[J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2128-2129
- [17] Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, et al. Multiple sequence alignment with Clustal X[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1998, 23(10): 403-405
- [18] Sneath PHA. BASIC program for a significance test for clusters in UPGMA dendrograms obtained from squared Euclidean distances[J]. Computers & Geosciences, 1979, 5(1): 127-137
- [19] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. Genetics, 2000, 155(2): 945-959
- [20] Ye X, Huang CY, Chen Q, et al. Making SSR fingerprint profile for commercial cultivars of *Lentinula edodes*[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13(6): 1067-1072 (in Chinese)
叶翔, 黄晨阳, 陈强, 等. 中国主栽香菇品种 SSR 指纹图谱的构建[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(6): 1067-1072
- [21] Kim KH, Kim YY, Ka KH, et al. Microsatellite markers for population-genetic studies of shiitake (*Lentinula edodes*) strains[J]. Genes & Genomics, 2009, 31(6): 403-411
- [22] Xiao Y, Liu W, Dai YH, et al. Using SSR markers to evaluate the genetic diversity of *Lentinula edodes*' natural germplasm in China[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(3): 527-536