

中国主栽香菇品种 SSR 指纹图谱的构建

叶翔^{1,2}, 黄晨阳², 陈强², 王钰¹, 张金霞²

(¹安徽大学, 合肥 230601; ²中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要:以商业栽培的 25 个香菇 (*Lentinula edodes*) 品种为材料, 应用 SSR 分子标记技术进行区别性分析。本研究使用 14 对引物, 引物的多态性为 100%, 每对引物产生的等位基因数为 2~9 个, 平均 5.0 个, 基因型数为 2~12 个, 平均 6.3 个。预期杂合度为 0.1151~0.8131, 平均预期杂合度为 0.6126; *PIC* 值为 0.1064~0.7736, 平均 *PIC* 值为 0.5541。25 个品种中, 除申香 10 号和申香 12 号不能区分外, 对其他 23 个品种清晰鉴别, 为构建香菇栽培品种的 SSR 分子指纹图谱提供了依据和方法。本方法获得的数据可以成为重复性良好、实验室内可比較的香菇栽培品种标准指纹图谱, 在品种特异性鉴定中不再需要已有所有品种做参照, 较 RAPD、ISSR、SRAP 等鉴定方法工作量大大减少。

关键词:栽培品种鉴定; 等位基因; 基因型; 杂合度

Making SSR Fingerprint Profile for Commercial Cultivars of *Lentinula edodes*

Ye Xiang^{1,2}, Huang Chen-yang², Chen Qiang², Wang Yu¹, Zhang Jin-xia²

(¹Anhui University, Hefei 230601; ²Institute of Agricultural Resources

and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The distinctness of 25 commercial cultivars was identified with SSR marker from 14 pairs of primers for *Lentinula edodes*. The polymorphism was 100% for the all of primers. The 2-9 alleles were generated for one primer pair and the 5.0 alleles was average to each primer pair. The 2-12 genotypes were formed for one primer pair and the 6.3 genotypes was average to each primer pair. The expect heterozygosity of 0.1151-0.8131 was presented and with average of 0.6216. The *PIC* values ranged from 0.1064 to 0.7736 and with average of 0.5541. The 23 varieties were separated clearly from each other by the 14 primer pairs except the one cluster consisted of Shenxiang 10 and Shenxiang 12. This result provided the basic technique for making SSR fingerprint profile to identify *Lentinula edodes* cultivars. The SSR profile is suitable to standard fingerprint for identification of the cultivars and it is well repeated and easily contrasted with various operators and labs compared with the profiles from RAPD, ISSR, and SRAP. The operator no longer puts all of the presented cultivars as reference to be tested in the identification so that the workload reduced greatly.

Key words: Cultivar identification; Allele; Genotype; Heterozygosity

香菇 [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] 因为其营养价值、保健价值和独特风味成为深受大众喜爱的食药两用菌之一^[1-3], 其人工栽培在我国已有 800 多年的历史, 是我国目前重要的栽培食用菌, 也是世界上产量仅次于双孢蘑菇的栽培食用菌。从 80 年代起, 我

国香菇产量超过日本, 成为香菇生产和出口第一大国。目前我国香菇产量占全世界的 70% 以上^[4]。

多年的分散生产和自身无性繁殖的特点, 导致栽培品种同物异名、同名异物严重, 为优良品种的正确使用和管理带来困难。香菇生长周期长, 子实体

收稿日期: 2012-02-24 修回日期: 2012-04-12

基金项目: 作物种质资源保护项目 (NB2010-2130135-37)

作者简介: 叶翔, 硕士研究生, 主要从事食用菌分子生物学研究, E-mail: sky05_yexiang@126.com

通信作者: 黄晨阳, 博士, 主要从事食用菌遗传育种及质量检测工作。E-mail: sdhcy@yahoo.com.cn

形态分化的多样性远较绿色植物低,且受环境影响较大,因此,应用形态进行栽培品种的鉴定难度较大。近年 RAPD(随机扩增多态性 DNA)标记技术, AFLP(扩增片段长度多态性)标记技术, ISSR(简单序列重复区间多态性)和 SSR(简单重复序列)等 DNA 分子标记技术在食用菌的品种鉴定工作中广泛应用^[5-10],较以栽培子实体形态的鉴定周期大大缩短。然而,应用这些方法只有同一批次的试验结果个体间的差异才具有可比性,而不同批次的样本相同个体间的差异缺乏可比性,因而不能成为可长期反复使用的品种特异性的标准指纹图谱。因此,在实际工作中,鉴定任何一个样本,都需要全部已有品种做参照样本才能进行,导致新品种的遗传特异性鉴定工作量越来越大。

SSR 分子标记^[11]具有数量多、在基因组内分布均匀、多态性信息丰富、易于检测和共显性标记等优点,被作为优良的遗传标记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^[12-15]。Kim 等^[16]使用 SSR 标记对中国、日本和韩国的香菇菌株进行了种群遗传学研究,将这些菌株划分为 6 个类群,并提出了香菇育种和品种分类的区分标准。Xiao 等^[17]使用 SSR 标记对中国野生香菇菌株进行遗传多样性分析,将中国野生香菇划分为 3 个群体,呈现基本的地域性聚类结果。

本研究以通过国家认定的香菇品种为材料,应用 SSR 分子标记进行遗传学分析,以探究 SSR 技术在香菇品种认定中遗传特异性鉴定的可用性,建立现有主栽香菇品种遗传特异性 SSR 分子指纹图谱,为香菇品种认定和良种使用奠定方法基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试品种为通过国家认定的 25 个香菇栽培品种(表 1),菌种保藏于国家食用菌标准菌种库(China Center for Mushroom Spawn Standards and Control, CCMSSC)。

1.2 菌丝培养及基因组 DNA 提取

菌种与 PDA 培养基 25℃ 活化培养,活化后的菌种于 PDA 平板培养基上 25℃ 隔膜避光培养 10d,刮取膜上菌丝用于基因组 DNA 的提取。基因组 DNA 使用 Plant Genomic DNA Kit(天根生化)试剂盒进行提取。

表 1 供试品种

Table 1 The tested cultivars of *Lentinula edodes*

序号 code	认定编号 Identified No.	原名称 Original name
1	国品认菌 2007001	申香 8 号
2	国品认菌 2007002	申香 10 号
3	国品认菌 2007003	申香 12 号
4	国品认菌 2007004	Cr-02
5	国品认菌 2007005	L135
6	国品认菌 2007006	闽丰 1 号
7	国品认菌 2007007	Cr-62
8	国品认菌 2007008	Cr-04
9	国品认菌 2007009	庆元 9015
10	国品认菌 2007010	香菇 241-4
11	国品认菌 2007011	武香 1 号
12	国品认菌 2007012	赣香 1 号
13	国品认菌 2007013	金地香菇
14	国品认菌 2007014	森源 1 号
15	国品认菌 2007015	森源 10 号
16	国品认菌 2007016	森源 8404
17	国品认菌 2008001	香九
18	国品认菌 2008002	香杂 26 号
19	国品认菌 2008003	广香 51 号
20	国品认菌 2008004	华香 8 号
21	国品认菌 2008005	华香 5 号
22	国品认菌 2008006	L952
23	国品认菌 2008007	菌兴 8 号
24	国品认菌 2008008	L9319
25	国品认菌 2008009	L808

1.3 引物

引物 14 对(表 2),其中 10 对为自行设计引物,4 对来自文献^[16-17],均由上海生工合成。

1.4 扩增条件

PCR 反应体系:20 μ l,其中 10 \times Ex *Taq* buffer (Mg²⁺ plus)2 μ l, dNTPs(各 2.5mmol)1.5 μ l,上游引物(10 μ mol)和下游引物(10 μ mol)各 1 μ l(引物序列见表 2), Ex *Taq* (5U/ μ l)0.1 μ l,模板 DNA 2 μ l, ddH₂O 12.4 μ l。

PCR 扩增程序:94℃ 预变性 4min; 94℃ 变性 30s,退火 30s(具体温度根据引物调节),72℃ 延伸 1min,35 个循环;72℃ 延伸 7min,4℃ 保存。

1.5 扩增产物检测

使用 Agilent 1000 Kit 试剂盒在 Agilent 2100 生物分析仪分析。

表 2 25 个香菇栽培品种的 SSR 引物信息

Table 2 The information of SSR primer pairs for the 25 cultivars of *Lentinula edodes*

引物名称 Primer name	GenBank 登录号 Gen Bank accession No.	序列(5'-3') Sequence	重复序列 Repeat	退火温度(°C) Annealing temperature	预期长度(bp) Expected length
S1	DD419801.1	CTTATTTCAGTGCCTAGATGG TTCGCTGGACTCGTCGTAT	(TC) ₇ tgctt(TG) ₅	52.3	184
S4	GQ225099.1	TTGTTTCGTTCTCGCTCTAA GCATTTCTCGCAGCAGTT	(CT) ₅	51.5	180
S13	AB055157.1	ACTTCCCTTTCTTTCTC GTATGTATGTTCCCTTTAT	(GGAT) ₃	49.3	340
S15	AB543787.1	ATTTCCTCACCTGGCTCA GCATCCGAATTTGCTACA	(TAG) ₃	51.1	234
S16	AB262360.1	ATAGGATGATTGAACGAGCAG ACCGTAAGGTGGGAAGAAA	(AG) ₅	51.6	271
S19	AB279630.1	ATGCCGTTCCAAAGATAC TTGAAGCCTGACAGAGTG	(TCC) ₅	50.6	193
S23	AB446463.1	TCTGTAACGCTTGTGACTA TTCTGAATGTACCCAATCTC	(AT) ₃ N ₉ (AT) ₃	49.2	308
S26	GQ118251.1	TTATCATGTTCGGAAGGG CAGGGTTGTAGAAGAAGTTGG	(TA) ₃ N ₃₁ (TCA) ₃	50.2	259
S30	E59667.1	CTCTTCAGGTACTTATG TACTGACCAAACCTGTTGT	[(CAGT) ₃ N ₁₂] ₄	44.1	357
Paa-1	AB027711.1	TGCTGTGGGTTCGCTCGTTAT TTCTGGCCTCGTCATTCTGT	(AGAT) ₅	54	110
A8 ^[16]	DQ231476	TCATCTCCTTCCCATGTTCC CAATACCGGTAACACGTCC	(GAG) ₃ N ₇ (TGG) ₃	54	286
X7 ^[17]	AB244760	TTATAGGCCCGGCCCACTT TCGCCGGGTATCGTATTGG	(ACTTG) ₃	62	298
X15 ^[17]	DQ231479	TTTGACTTCCTCCTCACC ACGAGGAAGTTGAAGTTGA	(GGT) ₆	50	197
F7 ^[17]	EB014197	CGAATGCTCTGCCCGTAT TACCCTTGACTCTCCGTGAC	(GAT) ₅	58	335

1.6 数据处理

使用 POPGENE ver. 1.32 软件^[18] 计算等位基因数、基因型数、有效等位基因数, 预期杂合度 (H_e)^[19] 和表观杂合度 (H_o)^[20] 等遗传学参数; 使用 PowerMarker 软件^[21] 计算多态信息量 (PIC , polymorphism information content)。

根据 Nei's 遗传距离, 使用非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UP-GMA) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 扩增结果

14 对引物, 每对都可对供试材料扩增形成图谱清晰的条带, 每对引物的条带多态性均为 100%。其中等位基因数最少为 2 个, 最多为 9 个, 平均等位基因数为 5.0 个。基因型数最少为 2 个, 最多为 12 个, 平均基因型数为 6.3 个 (表 3)。

表 3 SSR 扩增的遗传学参数信息

Table 3 The genetic parameters from SSR-PCR for the 25 cultivars of *Lentinula edodes*

引物 Primer	等位基因数 No. of alleles	基因型数 No. of genotypes	表观杂合度 Heterozygosity	预期杂合度 Expected heterozygosity	PIC
S1	4	8	0.6000	0.7608	0.6981
S4	2	3	0.0400	0.1151	0.1064
S13	7	6	0.6000	0.6833	0.6353
S15	2	2	0.4000	0.3265	0.2688
S16	3	4	0.0400	0.5657	0.4537
S19	5	7	0.7600	0.7265	0.6567
S23	9	12	0.6400	0.8131	0.7736
S26	4	4	0.6400	0.5086	0.4227
S30	7	7	0.0400	0.7551	0.7060
A8	6	8	0.6800	0.7273	0.6651
Paa-1	4	5	0.2400	0.4473	0.3933
X7	6	8	0.9200	0.7673	0.7146
X15	4	4	0.7200	0.5722	0.5022
F7	7	10	0.4800	0.8073	0.7612
平均	5.0	6.3	0.4857	0.6126	0.5541

2.2 遗传学参数

表 3 可以看出,表观杂合度最小为 0.0400、最大为 0.9200,平均表观杂合度为 0.4857;预期杂合度最小为 0.1151、最大为 0.8131,平均预期杂合度为 0.6126;PIC 值最小为 0.1064、最大为 0.7736,平均 PIC 值为 0.5541。

2.3 指纹图谱的构建

将所有引物的扩增结果拼接组合成 SSR 指纹图谱(图 1)。应用非加权组平均法对扩增结果的聚类分析,只有申香 10 号和申香 12 号不能区别,其他供试品种都可各自分开,统计结果显示材料间申香 10 号和申香 12 号之间的遗传相似性系数最大,为 1.000,香九和武香 1 号之间的遗传相似性系数最小,为 0.098(图 2)。

3 讨论

本试验使用的 14 对引物的平均 PIC 达到了 0.5541,显示了较高的多态信息量。但是部分引物 PIC 值较低,如 S4 仅 0.1046,多态信息量不高,这可能是本研究未能将供试材料全部区分的因素之一。另外,我国有的栽培品种间的亲缘关系较近,如未能区分开的申香 10 和申香 12,苏香是其共同的亲本^[22],也可能是重要原因。现有文献记载的香菇 SSR 引物较少,且大部分是基于 EST 序列和 ISSR 抑制法设计;另一方面,数据库中香菇核苷酸序列较

少,含有微卫星序列的核苷酸序列则更少,限制了 SSR 标记在香菇品种鉴定上的应用。

Zhang 等^[5]利用 FIASCO(Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats)法构建了金针菇微卫星文库,并开发了 10 对多态性 SSR 引物,用其中的 4 对,即将 14 个金针菇栽培品种有效鉴别。这为香菇微卫星文库的构建及 SSR 引物的开发提供了借鉴。

香菇品种的鉴定已有很多报道。Zhang 等^[6]使用 7 条 RAPD 引物区分了 13 个香菇栽培品种,Zhang 等^[7]用 2 条 ISSR 引物鉴别了 17 个中国的香菇栽培品种,Wu 等^[23]用 10 对 SCAR 引物区分了 6 个中国的香菇栽培品种,Fu 等^[24]用 23 对 SRAP 引物区分了 19 个中国的香菇栽培品种。这些方法分辨力良好,对材料的遗传特异性有较高的检出率,对材料的区分效果与本研究相同,但是,RAPD、ISSR 和 SRAP 图谱条带复杂,重复性和稳定性不高,使得同一样本在不同批次、不同实验室的试验结果缺乏可比性;SCAR 方法比较繁琐,存在假阳性现象。这些不足使其任何一个方法都不能用于标准图谱的建立。研究表明,SSR 分子标记产生的条带简单、清晰,均为 1 条或 2 条,易于统计分析,建立标准指纹图谱库,在新品种遗传特异性鉴定工作中,只需将待鉴定样本进行 SSR 扩增,将扩增结果与标准指纹图谱库进行对比分析即可,而不再需要已经鉴定过的参照样本做参照,大大减少了工作量。

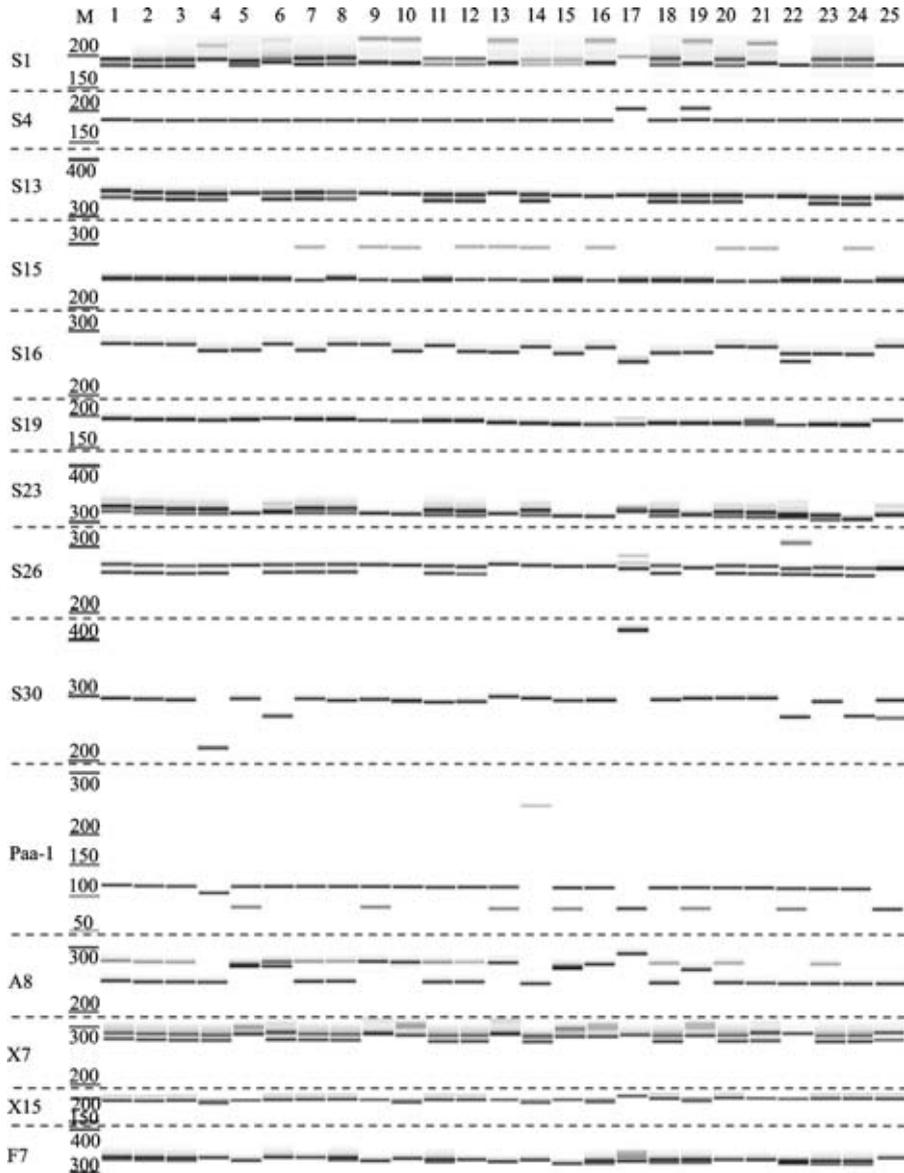


图 1 25 个香菇栽培品种的 SSR 指纹图谱

Fig. 1 The SSR fingerprint profile for the 25 cultivars of *Lentinula edodes*

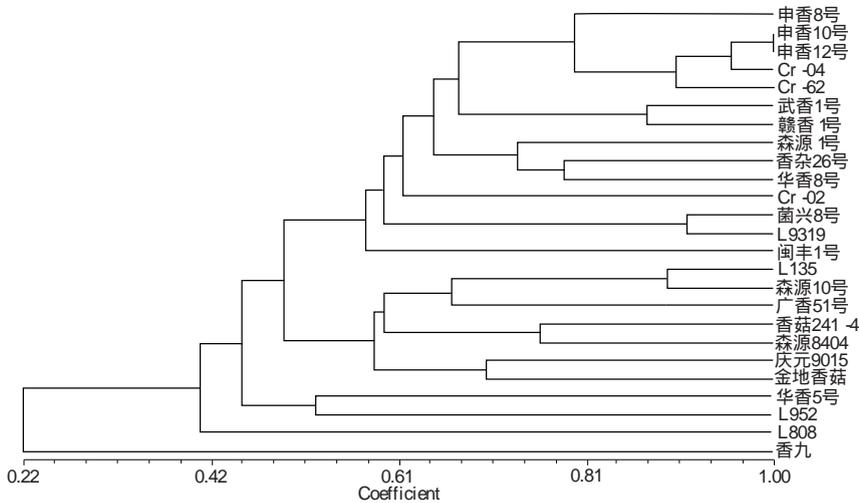


图 2 基于 SSR 标记的 25 个香菇品种的聚类图

Fig. 2 The cluster analysis dendrogram based on SSR markers for the 25 cultivars of *Lentinula edodes*

参考文献

- [1] Breene W M. Nutritional and medicinal value of special mushroom [J]. *J Food Protect*, 1990, 53(10): 883-894
- [2] 戴玉成, 杨祝良. 中国药用真菌名录及部分名称的修订[J]. *菌物学报*, 2008, 27(6): 801-824
- [3] 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 等. 中国食用菌名录[J]. *菌物学报*, 2010, 29(1): 1-21
- [4] Chang S T, Mile P G. Historical record of the early cultivation of *Lentinus* in China[J]. *Mushroom J Trop*, 1987, 7: 31-37
- [5] Zhang R Y, Hu D D, Zhang J X, et al. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for the mushroom *Flammulina velutipes*[J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, 110(3): 273-275
- [6] Zhang Y F, Molina F I. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, 131(1): 17-20
- [7] Zhang R Y, Huang C Y, Zheng S Y, et al. Strain-typing of *Lentinula edodes* in China with inter simple sequence repeat markers[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2007, 74: 140-145
- [8] Kazuhisa T, Matsumoto T, Hayashi E, et al. Construction of a linkage map of *Lentinula edodes* (shiitake) with the HEGS (high-efficiency genome scanning) system; use of versatile AFLP and PCR-based gene markers [J]. *Mycoscience*, 2006, 47(6): 336-346
- [9] 杜萍, 崔宝凯, 戴玉成. 野生毛木耳 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. *生物技术通报*, 2010(6): 130-137
- [10] 杜萍, 崔宝凯. 野生毛木耳 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2011, 30: 1166-1173
- [11] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-193
- [12] 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 Genet Biol*, 2003, 40(3): 207-214
- [13] Jany J L, 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]. *Mycol Res*, 2006, 110: 51-59
- [14] Roy M, Dubois M P, Proffit M, et al. Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* is an actual multihost symbiont [J]. *Mol Ecol*, 2008, 17(12): 2825-2838
- [15] Fisher M C, Koenig G, White T J, et al. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis* [J]. *Mol Biol Evol*, 2000, 17(8): 1164-1174
- [16] Kim K W, Kim Y Y, Ka K H, et al. Microsatellite markers for population-genetic studies of Shiitake (*Lentinula Edodes*) strains [J]. *Genes Genom*, 2009, 31(6): 403-411
- [17] Xiao Y, Liu W, Dai Y H, et al. Using SSR markers to evaluate the genetic diversity of *Lentinula edodes* natural germplasm in China [J]. *World J Microb Biot*, 2009, 26(3): 527-536
- [18] Yeh F C. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits [J]. *Belg J Bot*, 1997, 129: 157
- [19] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1987, 89(3): 583-590
- [20] Weir B S. *Genetic Data Analysis II* [M]. Sunderland: Sinauer Associates, 1996
- [21] Liu k, Muse S V. PowerMarker: integrated analysis environment for genetic marker data [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(9): 2128-2129
- [22] 卓英, 谭琦, 陈明杰, 等. 香菇主要栽培菌株遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *菌物学报*, 2006, 25(2): 203-210
- [23] Wu X Q, Li H B, Zhao W W, et al. SCAR markers and multiplex PCR-based rapid molecular typing of *Lentinula edodes* strains [J]. *Curr Microbiol*, 2010, 61: 381-389
- [24] Fu L Z, Zhang H Y, Wu X Q, et al. Evaluation of genetic diversity in *Lentinula edodes* strains using RAPD, ISSR and SRAP markers [J]. *World J Microb Biot*, 2010, 26: 709-716