

基于 SSR 标记的暗褐网柄牛肝菌遗传多样性分析

曹 旻, 何明霞, 高 锋, 刘 静, 张春霞, 许欣景

(云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100)

摘 要:以 33 份暗褐网柄牛肝菌样品为试材, 采用 SSR 标记技术, 对其遗传多样性进行研究, 以期暗褐网柄牛肝菌商业菌株鉴定奠定基础。结果表明: 15 个 SSR 标记中有 5 个标记在供试样品中表现出多态性, 每个标记检测到 2~6 个等位基因, 平均 3.20 个, Shannon's 信息指数平均值 0.76, 多态性信息含量平均值 0.43。聚类分析结果显示, 在相似系数为 0.99 时, 供试材料可被分为 11 个类群, 对应 11 种多位点分子表型, 与样品的来源有较好的对应关系。根据多位点分子表型构建了供试材料的 SSR 指纹图谱。

关键词:暗褐网柄牛肝菌; SSR 标记; 遗传多样性

中图分类号:S 646.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)08-0111-04

简单重复序列(SSRs, Simple sequence repeats), 又叫做微卫星位点(Microsatellites), 是由 1~6 bp 的重复单元串联重复而成的序列^[1]。它们在原核、真核基因组中广泛分布, 在基因编码区及非编码区都能找到^[2]。作为分子标记, SSR 有许多优点: 在整个基因组中分布广泛、均匀且数量充足, 因而多态性很高; SSR 标记呈孟德尔共显性遗传, 可以区分纯合、杂合基因型; PCR 扩增只需要少量 DNA, 且对 DNA 的质量要求不高。传统获得 SSR 标记的方法需通过建立、筛选基因组文库, 克隆测序, 引物设计等一系列试验, 耗费许多人力、物力。目前, 随着基因组测序越来越便捷, 由基因组数据中直接开发 SSR 标记的方法也被运用得越来越多^[3-4]。

暗褐网柄牛肝菌(*Phlebopus portentosus* (Berk & Broome) Boedijn) 属牛肝菌目小牛肝菌科(Boletinellaceae), 主要分布于泛热带地区, 包括国内的云南、四川、广西、海南等地, 国外的泰国、斯里兰卡、越南、印度尼西亚、澳大利亚、新西兰、非洲、墨西哥等

地^[5-11]。暗褐网柄牛肝菌俗名“黑牛肝菌”, 其味道鲜美, 营养丰富, 是云南南部及泰国北部最受欢迎的野生食用菌之一, 也是目前已知的唯一能够真正实现人工菇房栽培的可食用牛肝菌^[12-14]。该研究利用由基因组数据中开发、筛选到的 15 对暗褐网柄牛肝菌特异性 SSR 引物^[15], 对 33 份样品的遗传多样性进行分析, 以期有效利用分子标记评价暗褐网柄牛肝菌种质资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试 33 份暗褐网柄牛肝菌栽培菌株、标本均保存于云南省热带作物科学研究所, 其编号及来源见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和检测 使用 OMEGA 公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒提取样品总 DNA。电泳检测基因组 DNA 的提取情况: 将提取的 DNA 样品与 10×Loading Buffer(已加溴酚蓝)按 10:1 混合, 上样于 1% 的琼脂糖凝胶, 于 150 V 电压下电泳 10 min, 并于紫外灯下检测。

1.2.2 PCR 扩增反应 按照已公开专利^[15]中描述的 15 对暗褐网柄牛肝菌 SSR 引物序列, 委托昆明驰擎生物科技有限公司进行引物合成, 并在正向引物上加上 FAM 荧光标记。PCR 扩增反应体系 50 μL, 包括: 50 ng·μL⁻¹ 的模板 1 μL; 25 mmol·L⁻¹ 的 MgCl₂ 5 μL; 10 mmol·L⁻¹ 的 dNTPs 1 μL; 6 μmol·L⁻¹ 的

第一作者简介:曹旻(1983-), 女, 云南西双版纳人, 博士, 助理研究员, 现主要从事食用菌学等研究工作。E-mail: caoyang8352@163.com。

基金项目:国家自然科学基金地区基金资助项目(31560008); 云南省科研院所技术开发专项资助项目(2015DC014); 中国科学院“西部之光”人才培养资助项目(326); 景洪市科技三项经费资助项目(2013-46)。

收稿日期:2016-12-12

表 1 试验材料及来源

样品编号 Sample number	来源 Origin
13013	野生子实体,采自云南省西双版纳州勐海县打洛镇
15012	菌丝体,分离自柚子试验地子实体(接种 13013,当年出菇)
15012-161	菌丝体,分离自人工菇房 15012 子实体
15013-1	菌丝体,分离自柚子试验地子实体(接种 13013,当年出菇)
15013-2	子实体,采自人工大棚(接种 15013,当年出菇)
CL4	子实体,采自人工大棚(接种 13013,当年出菇)
11023	菌丝体,分离自云南省西双版纳州景洪市东风农场野生子实体
13006	子实体,采自凤凰木试验地(接种 11023,第 2 年出菇)
13007	子实体,采自凤凰木试验地(接种 11023,第 2 年出菇)
13008	子实体,采自凤凰木试验地(接种 11023,第 2 年出菇)
14018	子实体,采自凤凰木试验地(接种 11023,第 3 年出菇)
14019	子实体,采自凤凰木试验地(接种 11023,第 3 年出菇)
14020	子实体,采自凤凰木试验地(接种 11023,第 3 年出菇)
14021	子实体,采自凤凰木试验地(接种 11023,第 3 年出菇)
14022	子实体,采自凤凰木试验地(接种 11023,第 3 年出菇)
15018	菌丝体,分离自云南省景洪市嘎洒镇野生子实体
15010	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,金花生地
15011	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,金花生地
16003	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,芒果园
16005	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,芒果园
16006	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,芒果园
16007	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,芒果园
16008	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,芒果园
16009	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,芒果园
16012	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,菠萝蜜园
16013	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,菠萝蜜园
ZW1	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,紫薇园
ZW2	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,紫薇园
ZW3	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,紫薇园
ZW4	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,紫薇园
ZW5	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,紫薇园
ZW6	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,紫薇园
ZW7	子实体,采自云南省景洪市热带花卉园,紫薇园

前、后引物各 1 μL ; 5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 DNA *Taq* 酶 0.2 μL ; PCR 反应缓冲液 5 μL ; 去离子水 35.8 μL 。PCR 扩增反应使用降落 PCR(Touchdown PCR)反应,反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,60~52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物上样,用 1.0% 的琼脂糖凝胶、1 \times TBE 电泳液中电泳检测。PCR 产物使用 ABI 3730 测序仪进行基因分型。

1.3 项目测定

采用 Popgene 32^[16] 计算等位基因数(Observed-number of alleles, *Na*)、有效等位基因数(Effective-number of alleles, *Ne*)、Shannon's 信息指数(Shannon's information index, *I*)、期望杂合度(Expected heterozygosity, *He*)、观测杂合度(Observed heterozygosity, *Ho*)。多态性信息含量(*PIC*, polymorphism

information content)^[17]按公式 $PIC=1-\sum f_i^2$ 计算, f_i 为第 i 个等位基因的频率,当 $PIC<0.25$ 表示低度多态性, $0.25<PIC<0.50$ 表示中度多态性, $PIC>0.50$ 为高度多态性。

1.4 数据分析

对于 ABI 3730 测序仪下机数据,使用软件 Gene mapper 4.1(Applied Biosystems Co. Ltd., USA),参照引物对应关系的核心碱基重复数进行数据准确位点的分析。应用 NTSYSpc-2.10^[18] 软件计算遗传相似系数,用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记的多态性评价

15 对 SSR 引物在供试的 33 份暗褐网柄牛肝菌样品中均能扩增出对应的 PCR 产物,其中 5 个位点表现出多态性(表 2)。5 个位点共检测到 16 个等位基因,每个位点 2~6 个,平均 3.20 个;有效等位基因数 1.40~4.08,平均值 2.05;观测杂合度 0.21~0.61,平均值 0.37;期望杂合度 0.29~0.77,平均值 0.43;Shannon's 信息指数 0.52~1.60,平均值 0.76;多态性信息含量 0.29~0.75,平均值 0.43,其中 4 个位点大于 0.25,小于 0.50,为中度多态性位点,1 个位点(PP32087)大于 0.50,为高度多态性位点。以上数据显示,这 5 个 SSR 标记在供试样品中的多态性适中,能够反映这些样品的遗传多样性。

表 2 5 个 SSR 标记的多态性评价

Table 2 Polymorphism evaluation of 5 SSR markers

SSR 标记 SSR marker	等位基 因数 <i>Na</i>	有效等位 基因数 <i>Ne</i>	观测杂 合度 <i>Ho</i>	期望杂 合度 <i>He</i>	Shannon's 信息指数 <i>I</i>	多态性信 息含量 <i>PIC</i>
PP32087	6	4.08	0.61	0.77	1.60	0.75
PP39117	3	1.43	0.33	0.31	0.53	0.30
PP50097	2	1.83	0.21	0.46	0.65	0.45
PP76127	3	1.40	0.27	0.29	0.53	0.29
PP93120	2	1.50	0.42	0.34	0.52	0.33
平均	3.20	2.05	0.37	0.43	0.76	0.43

2.2 聚类分析及多位点分子表型分析

根据上述 5 个 SSR 位点的基因分型结果,对 33 份暗褐网柄牛肝菌材料进行了聚类分析(图 1)。供试材料的遗传相似性系数平均值为 0.67,最大值为 1.00,最小值为 0.31。

在相似系数为 0.99 时,供试材料被分为 11 个类群,对应着 11 个多位点分子表型。由对照样品来源可以看到,样品 13013 及其菌丝体无性繁殖的子代均属于表型 A;采自菠萝蜜园的 2 个样品均属于

表型 G; 采自紫薇园的 7 个样品均属于表型 H; 采自芒果园的 6 个样品均属于表型 I; 用于接种凤凰木试验地的 11023 菌株及第 2、3 年采自该试验地的样品分属于表型 B、E、F 和 K, 说明这些样品虽然均采自曾接种 11023 的凤凰木试验地, 但并非全部来源于

11023 的菌丝体无性繁殖子代, 还存在其它外来菌株。以上结果表明, 这 5 个 SSR 标记能够较好地反映供试样品是否来源于同一菌株无性繁殖系, 可作为暗褐网柄牛肝菌菌种鉴定, 构建 SSR 指纹图谱的候选标记。

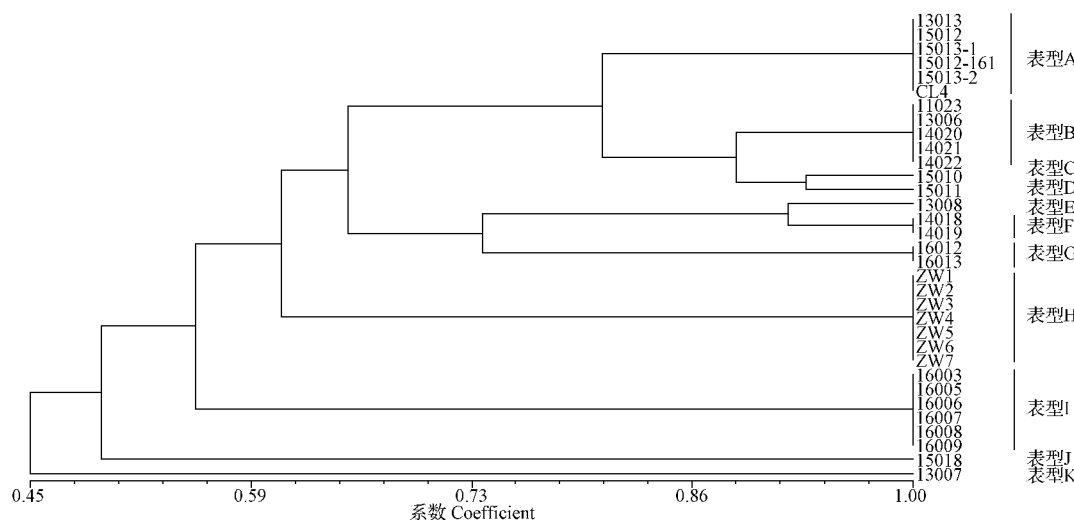


图 1 基于 SSR 标记的 33 份暗褐网柄牛肝菌样品的 UPGMA 系统聚类分析

Fig. 1 UPGMA dendrogram of 33 *P. portentosus* samples based on SSR markers

2.3 供试材料的 SSR 指纹图谱

基于这 5 个 SSR 标记对每份暗褐网柄牛肝菌样品的多位点分子表型进行编码, 构建了 SSR 指纹图谱, 获得了 16 位数的分子指纹图谱号码(表 3)。每个指纹图谱对应一种多位点分子表型, 可用于快速鉴别供试暗褐网柄牛肝菌样品。

表 3 33 份暗褐网柄牛肝菌样品的分子指纹图谱

Table 3 Code of molecular fingerprinting for 33 *P. portentosus* samples

样品编号 Sample number	多位点分子表型 Molecular phenotype	分子指纹图谱编码 Code of molecular fingerprinting
13013, 15012, 15013-1, 15013-2, 15012-161, CL4	表型 A	0001000010101011
11023, 13006, 14020, 14021, 14022	表型 B	0001000011101001
15010	表型 C	0001011011101001
15011	表型 D	0001010011101001
13008	表型 E	0011000011001001
14018, 14019	表型 F	0011001011001001
16012, 16013	表型 G	0010010011011001
ZW1, ZW2, ZW3, ZW4, ZW5, ZW6, ZW7	表型 H	0000111011001011
16003, 16005, 16006, 16007, 16008, 16009	表型 I	1100000011011001
15018	表型 J	0000010010100111
13007	表型 K	0010001100111001

3 讨论

随着基因组测序越来越便捷, 由基因组数据中直接开发 SSR 标记的方法也被运用得越来越多, 大型真菌中已报道的包括黑块菌 (*Tuber melanosporum*)^[3]、灵芝 (*Ganoderma lucidum*)^[4]、双色蜡蘑 (*Laccaria bicolor*)^[19]、草菇 (*Volvariella volvacea*)^[20]、香菇 (*Lentinula edode*)^[21] 等。该研究中所使用的 15 个 SSR 标记也来自于基因组数据的开发^[15], 但可能由于样品数量及采样范围的影响, 这 15 个已被筛选过的 SSR 标记在该研究的供试样品中仅有 5 个标记表现出了多态性特征。每个位点检测到 2~6 个等位基因, Shannon's 信息指数平均值 0.76, 多态性信息含量反映出其中 4 个位点为中度多态性位点, 1 个位点为高度多态性位点。以上数据显示, 这 5 个 SSR 标记在该研究供试样品中具有适中的多态性, 可用于这些样品的遗传多样性研究。

通过供试样品的聚类分析发现, 33 份样品可被分为 11 个类群, 对应着 11 种多位点分子表型, 这种划分与样品来源有一定的对应关系, 能够很好地反映出样品是否来源于同一菌株的无性繁殖子代。因此, 这 5 个 SSR 标记可作为暗褐网柄牛肝菌菌种鉴定, 构建 SSR 指纹图谱的候选标记。通过对多位点分子表型进行编码, 构建了供试样品的 SSR 指纹图

谱,获得了 16 位数的分子指纹图谱号码。

该研究中检验的 5 个 SSR 标记,可用于快速鉴别供试样品,减少后续栽培驯化试验的重复劳动,提高高产菌株筛选及遗传育种的效率。随着将来样品量的增大,更多有效的 SSR 标记将被开发,并进一步运用于暗褐网柄牛肝菌商业品种鉴定及遗传多样性研究中。

参考文献

- [1] SHARMA P C, GROVER A, KAHL G. Mining microsatellites in eukaryotic genomes[J]. Trends Biotechnol, 2007, 25: 490-498.
- [2] LI Y C, KOROL A B, FAHIMA T, et al. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution[J]. Mol Biol Evol, 2004, 21: 991-1007.
- [3] MURAT C, RICCONI C, BELFIORI B, et al. Distribution of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new molecular markers[J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48: 592-601.
- [4] JUN Q, HAIBIN X, JINGYUAN S, et al. Genome-wide analysis of simple sequence repeats in the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Gene, 2013, 512: 331-336.
- [5] 臧穆. 我国东喜马拉雅及其邻区牛肝菌目的研究(续)[J]. 云南植物研究, 1986, 8(1): 1-22.
- [6] 臧穆. 中国真菌志[M]. 第 22 卷. 北京: 科学出版社, 2006: 1-215.
- [7] 杨祝良, 臧穆. 中国南部高等真菌的热带亲缘[J]. 云南植物研究, 2003, 25(2): 129-144.
- [8] HEINEMANN P, RAMMELOO J. Observations sur le genre *Phlebopus*(Boletineae)[J]. Mycotaxon, 1982, 15: 384-404.
- [9] BARBARA P S. An annotated checklist of Agarics and Boleti recorded from New Zealand[J]. New Zealand Journal of Botany, 1987, 25(2): 185-215.
- [10] WATLING R. The relationships and possible distributional patterns of Boletes in South-East Asia[J]. Mycological Research, 2001, 105(12): 1440-1448.
- [11] BANDALA V M, MONTOYA L, JARVIO D. Two interesting records of Boletes found in coffee plantations in Eastern Mexico[J]. Persoonia, 2004, 18(3): 365-380.
- [12] 张春霞, 纪开萍, 何明霞, 等. 暗褐网柄牛肝菌子实体营养成分分析[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2010, 32(6): 702-704.
- [13] JI K P, CAO Y, ZHANG C X, et al. Cultivation of *Phlebopus portentosus* in southern China[J]. Mycological Progress, 2011, 10: 293-300.
- [14] SANMEE R, LUMYONG P, DELL B, et al. *In vitro* cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand[J]. Mycoscience, 2010, 51: 15-22.
- [15] 云南省热带作物科学研究所, 云南大学. 暗褐网柄牛肝菌 SSR 分子标记: CN 104946763 A[P]. 2015-09-30.
- [16] YEH F C, YANG R C, BOYLE T B J, et al. POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis[M]. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre University of Alberta, 1997.
- [17] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [18] ROHLF F J. NTSYSpc: numerical taxonomy system, ver. 2. 10 [R]. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY, 2000.
- [19] LABBÉ J, MURAT C, MORIN E, et al. Survey and analysis of simple sequence repeats in the *Laccaria bicolor* genome, with development of microsatellite markers[J]. Current Genetics, 2011, 57(2): 75-88.
- [20] WANG Y, CHEN M, WANG H, et al. Microsatellites in the genome of the edible mushroom, *Volvariella volvacea*[J]. Biomed Research International, 2014(1): 234-240.
- [21] 张丹, 宋春艳, 章炉军, 等. 基于全基因组序列的香菇商业菌株 SSR 遗传多样性分析及多位点指纹图谱构建的研究[J]. 食用菌学报, 2014(2): 1-13.

Genetic Diversity Analysis of *Phlebopus portentosus* Based on SSR Markers

CAO Yang, HE Mingxia, GAO Feng, LIU Jing, ZHANG Chunxia, XU Xinjing
(Yunnan Institute for Tropical Crop Research, Jinghong, Yunnan 666100)

Abstract: In this study, the genetic diversity of 33 *Phlebopus portentosus* materials was analyzed by using SSR markers in order to lay the foundation of commercial strains identification of *Phlebopus protentaosus*. The results showed that 5 out of 15 SSR markers represented polymorphism in testing samples, 2—6 alleles were found in each marker and the mean value was 3.20. The average values of Shannon's information index and polymorphism information content were 0.76 and 0.43 respectively. The testing samples were clustered into 11 groups at the genetic similarity 0.99 on a UPGMA dendrogram, which corresponded to 11 multiple loci molecular phenotypes and the cloning origin of the samples. The codes of SSR fingerprinting were constructed based on these multiple loci molecular phenotypes.

Keywords: *Phlebopus portentosus*; SSR markers; genetic diversity