

doi:10.11937/bfyy.20171202

## SRAP 法鉴定黑木耳菌种真实性

姚方杰<sup>1,2</sup>, 鲁丽鑫<sup>2</sup>, 王 鹏<sup>2</sup>, 张友民<sup>1</sup>, 姚允武<sup>3</sup>, 李宏月<sup>1</sup>

(1. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 食药菌教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118;

3. 吉林省海外农业投资开发集团有限公司, 吉林 长春 130118)

**摘 要:**该研究详细介绍了采用 SRAP 法鉴定黑木耳菌种真实性标准的具体内容, 为生产者提供科学有效、简易操作的菌种鉴定方法, 为育种者知识产权保护提供有效途径。

**关键词:**黑木耳; 菌种; 真实性鉴定; SRAP

**中图分类号:**S 646.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2017)24-0178-05

我国是黑木耳(*Auricularia heimuer*)生产和消费大国<sup>[1]</sup>, 占世界产量的 98% 以上, 但是国内尚无黑木耳菌种真实性鉴定的相关标准。在生产中因为缺乏科学有效的菌种鉴定方法, 造成菌种混杂退化, 无法充分发挥优良菌种种性, 菌种知识产权侵害事件屡有发生<sup>[2-3]</sup>。

DNA 分子标记, 是基于品种间 DNA 碱基序列的差异进行检测, 从而达到快速鉴别品种的一种现代生物手段<sup>[4]</sup>。相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是一种基于 PCR 的新型标记系统<sup>[5]</sup>。通过正反向引物对 ORFs 区域中含子、启动子进行特异扩增。因不同物种以及个体内含子、启动子与间隔区序列长度不等而产生多态性<sup>[6-7]</sup>。该标记具有多态性高、重复性好、操作简单、引物具有通用性、正反向引物可自由组合成引物对、引物使用率高引物合成成本低的特点<sup>[8]</sup>, 广泛应用到种质资源评价、遗传多样性分析、连锁图谱构建和菌株亲缘关系鉴定等研究。

课题组采用 SRAP 方法对 100 多个黑木耳菌株进行多态性分析, 优化 SRAP-PCR 反应体系, 筛选出 14 对适宜引物组合, 结果表明该方法能够在 DNA 水平上对黑木耳菌种进行真实性鉴定。该研究介绍了采用 SRAP 法鉴定黑木耳菌种真实性标准的具体内容, 旨在为防止黑木耳菌种混杂退化、充分发挥优良菌种种性、保护菌种知识产权提供规范的方法及技术支持, 推动我国食用菌菌种可追溯制度的建立与实施, 以期促进黑木耳乃至所有食用菌产业的可持续发展。

### 1 范围

该标准规定了黑木耳菌种真实性 SRAP 法的术语和定义、原理、材料与方法。该标准适用于黑木耳菌种真实性鉴定。

### 2 术语与定义

#### 2.1 引物(Primer)

适用于黑木耳菌株真实性鉴定的一定长度和顺序的寡核苷酸链。

#### 2.2 PCR 空白对照(PCR control)

以无菌水作为模板进行 PCR 反应, 以验证 PCR 反应过程中是否发生污染。

#### 2.3 阴性提取对照(Negative control)

水作为材料提取 DNA, 以证明黑木耳 DNA 在制备过程中是否发生污染。

**第一作者简介:**姚方杰(1965-), 女, 博士, 教授, 研究方向为食用菌遗传育种与高效栽培。E-mail: yaofj@aliyun.com.

**责任作者:**张友民(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物学与湿地植物生态科学。E-mail: zhangymf@aliyun.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31272219)。

**收稿日期:**2017-08-03

### 3 原理

对黑木耳菌种的 ORFs 区域中内含子、启动子进行特异扩增,检测和比较该序列长度多态性。通过对 PCR 产物的检测和比较,识别黑木耳菌种基因组 DNA 的多态片段,鉴定菌种的真实性。

### 4 材料与方法

#### 4.1 试验材料

培养基:200 g 新鲜马铃薯,20 g 葡萄糖,加去离子水或相当纯度的水补齐至 1 000 mL, pH 自然。100 mL 三角瓶装 50 mL 左右。

试剂:4 种脱氧核糖核苷酸(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)混合溶液, *Taq* DNA 聚合酶,核酸染料, DNA 分子量标记,液氮,剥离硅烷,亲和硅烷。

试剂配制。1 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH 8.0): 12.11 g 三羟甲基氨基甲烷(C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, Tris)溶解于 80 mL 去离子水中,冷却至室温后用浓盐酸调节溶液的 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL,高压灭菌。0.5 mol · L<sup>-1</sup> 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA-2Na)溶液:称取 37.22 g 二水乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na · 2H<sub>2</sub>O)溶解于 160 mL 水,磁力搅拌,用 NaOH 调节溶液的 pH 至 8.0,然后定容至 200 mL,高压灭菌。CTAB 提取缓冲液:称取 16.364 g 氯化钠溶解于 70 mL 去离子水中,加入 4 g 溴代十六烷基三甲胺(CTAB),完全溶解,再加入 20 mL 1 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0)、8 mL 0.5 mol · L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8.0),用水定容至 100 mL,高压灭菌。使用前加入 0.1% (V/V)的 β-巯基乙醇。CTAB 纯化缓冲液:称取 4.1 g NaCl 溶于 80 mL 水中,慢慢加入 10 g CTAB,55 °C 加热溶解,定容至 100 mL。氯仿异戊醇(24:1):氯仿和异戊醇以 24:1 的体积比进行配制,置于 4 °C 冰箱中保存。酚-氯仿异戊醇(25:24:1):三者按 25:24:1 的体积比进行配制,4 °C 保存。70%乙醇溶液:量取 70 mL 无水乙醇,加水定容至 100 mL。30%丙烯酰胺溶液:称取 290 g 丙烯酰胺(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO, Arc)、10 g 甲叉双丙烯酰胺(C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Bis)加水定容至 1 000 mL。10%过硫酸铵:称取 1 g 过硫酸铵,定容至 10 mL,4 °C 保存(保存时间为 1 周)。8%聚丙烯酰胺凝胶

溶液:量取 5×TBE 缓冲液 200 mL,30%丙烯酰胺溶液 265 mL,加水定容至 1 000 mL。5×TBE 缓冲液:分别称取三羟甲基氨基甲烷(Tris)53.9 g 和硼酸 27.5 g,溶于 800 mL 水中,加入 20 mL 0.5 mol · L<sup>-1</sup> 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA-2Na)的水溶液(pH 8.0),用水定容至 1 000 mL。1×TBE 缓冲液:量取 5×TBE 缓冲液 100 mL,加水定容至 500 mL。0.1%硝酸银(AgNO<sub>3</sub>)溶液:称取 1 g 硝酸银(AgNO<sub>3</sub>)加水定容至 1 000 mL。显影液:称取 8 g 氢氧化钠(NaOH)和 8 mL 37% 甲醛加入 1 000 mL 水中,混匀。

仪器:PCR 扩增仪,高速冷冻离心机(转速在 10 000 r · min<sup>-1</sup> 以上),紫外分光光度计,全温摇瓶柜(精度±0.1 °C),凝胶成像系统,电热恒温水浴槽(精度±0.1 °C),垂直板电泳槽,稳压稳流电泳仪,分析天平(感量 0.01、0.000 1 g 各 1 台)。

引物:14 对 SRAP 引物序列见表 1。

表 1 SRAP 引物组合序列  
Table 1 SRAP primer combinations sequence

序号	引物组合	引物序列 5'-3'	
		上游	下游
1	me1+em2	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTTGC
2	me1+em5	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTAAC
3	me1+em6	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTGCA
4	me1+em8	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTAGC
5	me2+em4	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTTGA
6	me2+em5	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTAAC
7	me3+em2	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTTGC
8	me3+em3	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTGAC
9	me4+em8	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTAGC
10	me5+em1	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTAAT
11	me5+em3	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTGAC
12	me6+em2	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAATTTGC
13	me6+em6	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAATTGCA
14	me6+em7	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAATTATG

#### 4.2 试验方法

##### 4.2.1 菌丝体培养

直接将接种块接入三角瓶液体培养基中,25 °C,120 r · min<sup>-1</sup> 避光振荡培养 20 d。

##### 4.2.2 DNA 样品提取<sup>[9-10]</sup>

菌丝培养量以可做 3 次平行试验为准,固体方法培养的菌丝,称取 0.2 g 菌丝,液体培养的菌丝,无菌水冲洗 3 次,用滤纸吸干水分备用,称取菌丝 0.5 g,置研钵中,在液氮中充分研磨成粉末,迅速转入 1.5 mL 离心管中,加入 650 μL

65℃预热的CTAB提取缓冲液。混匀后置于65℃水浴40 min,轻轻地摇动混匀。离心管降至室温,加入等体积的酚-氯仿异戊醇,振荡混匀,4℃,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min;将上清液转移至已灭菌的1.5 mL离心管中,弃沉淀。加入等体积的氯仿异戊醇,4℃,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,将上清液转移至已灭菌的1.5 mL离心管中,弃沉淀。加入2倍体积预冷的无水乙醇,静置沉淀60 min,用无菌枪头挑取白色絮状物至干净离心管中,无水乙醇充分挥发。70%乙醇漂洗沉淀,晾干乙醇充分挥发,剩余无色透明状物质黑木耳基因组DNA。用100 μL的无菌水充分溶解DNA,加入2 μL RNAase,37℃恒温静置8~12 h。取出上述静置的DNA溶液,用无菌水补足至300 μL,加入5M NaCl 50 μL,CTAB纯化缓冲液40 μL,65℃水浴10 min。获得黑木耳基因组DNA,-20℃分装保存备用。不宜反复冻融使用。

#### 4.2.3 DNA样品合格性确认

凝胶电泳检测。凝胶成像:取5 μL上述溶液与1 μL加样缓冲液混匀,在0.8%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。

筛选判定。与DNA分子量标记比较,观察所提取的基因组DNA质量及片段大小,按下列标准判定:a)在点样孔附近呈现一条致密亮带,表明是质量好、分子量大且无降解的DNA样品,可用于鉴定;b)呈现连续分布状态,表明是部分降解的DNA样品,不建议用于鉴定;c)观察不到大片段,表明是严重降解的DNA样品,不可用于鉴定。

基因组A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>的OD值检测。无菌水清洗微量核酸检测仪的点样孔3次,并校正对照数值为零。将DNA适当稀释,取1 μL DNA样品在微量核酸检测仪的点样孔,重复3次读取A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>的OD值,依据测得的质量浓度将DNA溶液稀释到25~50 ng·μL<sup>-1</sup>。

PCR反应。引物见表1。如果必要可以筛选新的引物。PCR反应的总体积为10 μL,含有10×PCR反应缓冲液2 μL,150 μmol·L<sup>-1</sup> dNTP 1 μL,1 U Taq聚合酶0.3 μL,引物浓度300 pmol·L<sup>-1</sup>各0.5 μL,50 ng·μL<sup>-1</sup>模板DNA 1 μL,其余用灭菌的双蒸馏水补充至10 μL。按上述比例将反应液依次加入0.2 mL

离心管中,混匀,进行PCR扩增。设置PCR空白对照。

反应条件。95℃预变性5 min;95℃变性30 s,35℃退火1 min,72℃延伸1 min,5个循环;95℃变性30 s,50℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸10 min,4℃保存。

聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。玻璃板处理:将玻璃板清洗干净,用双蒸水反复冲洗自然晾干,再用无水乙醇擦拭2遍,吸水纸吸干;在凹板玻璃上涂上剥离硅烷,长板玻璃上涂上亲和硅烷,涂抹均匀,待玻璃板彻底干燥后进行电泳装置组装,胶板厚度0.4 mm。制胶:取100 mL配制好的8%聚丙烯酰胺胶,加入10%新配制的过硫酸铵700 μL和TEMED 65 μL,混匀后,进行灌胶,待胶液充满玻璃板夹层,插入样品梳,注意梳齿下不要产生气泡,凝胶聚合时间2 h以上。预电泳:胶聚合后拔出梳齿,用双蒸水冲洗点样孔,冲掉碎胶,将凝胶板安装到电泳槽,夹紧,加入1×TBE电极缓冲液,检查设备连接正常后,160 V电压预电泳2 h。

电泳。预电泳结束后,用移液器轻轻敲打胶面,除去气泡和杂质,每个点样孔加样8 μL PCR扩增产物,加样结束后,以200 V恒压电泳,电泳过程中确保胶板温度不高于50℃以免玻璃破裂。待前沿指示剂距胶底2~3 cm处停止电泳。

银染。电泳结束后,小心取出玻璃板并分开,将凝胶附着的长玻璃板用双蒸水冲洗15 s,重复2次,再转入0.1% AgNO<sub>3</sub>溶液中,轻轻摇动染色8 min,然后用双蒸水快速漂洗15 s,放入显影液中轻摇至条带清晰可辨为止,最后用双蒸水冲洗2次。

### 4.3 数据分析

#### 4.3.1 结果记录

电泳结束后,将聚丙烯酰胺凝胶置于凝胶成像仪上成像。根据DNA分子量标记判断扩增出的目的条带的大小,将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。

#### 4.3.2 PCR产物质量判断

观察空白对照的凝胶成像照片,按下列结果判断:a)空白对照为阴性,并且3个平行试验结果一致,则该次试验结果可以使用;b)在阴性提取对照或PCR空白对照中扩增出了片段,则说明检测过程中发生了污染,需查找原因重新检测。

### 4.3.3 判定分析

将供检黑木耳菌株 PCR 扩增的条带与对照菌株比较,若有显著差别,遗传相似系数小于 1,可判定供检菌种与对照菌种为不同菌种;若供检菌种与对照菌种的 PCR 产物一致,再增加引物个数,进行检测验证。必要时可以增加其它方法佐证。

## 5 讨论与结论

菌种真实性鉴定是指待测样品通过与已知品种标准指纹数据比对平台筛查比较,确定待测样品的真实品种名称<sup>[11]</sup>。目前,已有 2 个食用菌菌种真实性鉴定的通用方法标准《食用菌菌种真实性鉴定 RAPD 法》和《食用菌菌种真实性鉴定 ISSR 法》,但黑木耳与很多常见食用菌在分类上分属不同目级,通过团队及同行的研究,2 种通用方法不能完全鉴定黑木耳菌种。与 ISSR 法和 RAPD 法相比较,SRAP 法电泳的多态性条带多,能够反映的遗传信息更丰富,更适用于黑木耳菌种的真实性鉴定<sup>[12-14]</sup>,这一结果与真姬菇<sup>[15]</sup>和金针菇<sup>[16]</sup>的菌种鉴定研究结果一致。

SRAP 分子标记检测扩增条带的方法有 2 种:聚丙烯酰胺凝胶电泳和琼脂糖凝胶电泳。琼脂糖电泳法操作简单、用时短、成本低,但检测条带灵敏度不高,聚丙烯酰胺凝胶电泳法技术要求较高,操作时间长,但灵敏度更高,更能准确反映扩增产物的信息<sup>[17-19]</sup>。在鉴定黑木耳菌种真实性中,电泳检测扩增的条带数直接影响鉴定结果,扩增条带越多,反映的遗传信息越完全,因此,聚丙烯酰胺凝胶电泳法更适用于该标准。

### 参考文献

- [1] 吴芳,戴玉成.黑木耳复合群中种类学名说明[J].菌物学报,2015(4):604-611.
- [2] 姚方杰,边银丙.图说黑木耳关键栽培技术[M].北京:中国农业出版社,2010:42.
- [3] 姚方杰,张友民,鲁丽鑫,等.黑木耳遗传育种研究进展[J].

菌物研究,2015(3):125-128,122.

- [4] 张敏琴,杜才富,韩宏仕,等.应用 SRAP 标记鉴定油菜杂交种真实性研究初探[J].种子,2013,32(8):33-36.
- [5] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
- [6] 柳李旺,龚义勤,黄浩,等.新型分子标记-SRAP 与 TRAP 及其应用[J].遗传,2004(5):777-781.
- [7] 徐操,赵宝华. SRAP 分子标记的研究进展及其应用[J]. 生命科学仪器, 2009(4): 24-27.
- [8] 李严,张春庆. 新型分子标记-SRAP 技术体系优化及应用前景分析[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 108-112.
- [9] 王晓娥,姚方杰,张友民,等. 木耳属菌株 ITS 序列作为 DNA 条形码的可行性[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(7): 111-114.
- [10] 王晓娥,姚方杰. 块菌 rDNA 的 ITS 序列分析试验条件的初步研究[J]. 中国食用菌, 2006, 25(5): 37-39.
- [11] 王风格,易红梅,赵久然,等. 玉米真实性 SSR 鉴定标准的研制及应用[J]. 玉米科学, 2016, 24(4): 61-66.
- [12] 刘华晶,许修宏,姜廷波. 大兴安岭地区野生黑木耳菌株 SRAP 的遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2011(13): 2641-2649.
- [13] TANG L H, XIAO Y, LI L, et al. Analysis of genetic diversity among Chinese *Auricularia auricula* cultivars using combined ISSR and SRAP markers[J]. Current Microbiology, 2010, 61(2): 132-140.
- [14] 李媛媛. SRAP 标记和 SCAR 标记在黑木耳栽培菌株分类鉴定中的应用[D]. 长春:吉林农业大学, 2013.
- [15] 李翠翠,郭立忠,卢伟东,等. RAPD 和 SRAP 分子标记在真姬菇菌种鉴定中的应用[J]. 食用菌学报, 2009, 16(1): 21-25.
- [16] 郭钟尧,姜辉,贾培培,等. RAPD 和 SRAP 分子标记在金针菇菌种鉴定中的应用[J]. 食用菌, 2011(2): 15-17.
- [17] 谢成婕,童方丽,肖立民,等. 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳和琼脂糖水平电泳检测基因型的比较研究[J]. 广东牙病防治, 2011, 19(8): 395-397.
- [18] 张彦苹,曹尚银,初建青,等. 16 份石榴 RAPD 扩增产物的两种电泳方法检测及其序列特征[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(5): 890-896.
- [19] 王爱娜,王灏,李殿荣,等. 琼脂糖与聚丙烯酰胺凝胶电泳在 SSR 鉴定杂交油菜种子纯度中的比较[J]. 西北农业学报, 2012(8): 101-106.

## Verification of Genuineness for Spawn of *Auricularia heimuer* by SRAP

YAO Fangjie<sup>1,2</sup>, LU Lixin<sup>2</sup>, WANG Peng<sup>2</sup>, ZHANG Youmin<sup>1</sup>, YAO Yunwu<sup>3</sup>, LI Hongyue<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Changchun, Jilin 130118; 3. Jihai Agricultural Investment & Development Group Co. Ltd., Changchun, Jilin 130118)

doi:10.11937/bfyy.20171661

# 一株野生侧耳属菌株的鉴定及生物学特性

宋冰<sup>1</sup>, 付永平<sup>1</sup>, 郭昱秀<sup>1</sup>, 李长田<sup>1</sup>, 张志武<sup>2</sup>, 李玉<sup>1</sup>

(1. 吉林农业大学 食药菌教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118;

2. 华盛顿州立大学 作物和土壤科学系, 美国 华盛顿 99164)

**摘要:**以1株野生侧耳属菌株为试材,采用ITS序列克隆和分析,并结合传统形态学研究对其进行分类鉴定,通过单因素试验确定该菌株的生物学特性。结果表明:该野生菌株为紫孢侧耳(*Pleurotus sapidus*),其菌丝生长的最佳碳源为玉米粉,最佳氮源为牛肉膏,最适培养温度为30℃,最适pH 7.0。该研究为加快紫孢侧耳的推广和产业化提供了基础和种质资源。

**关键词:**紫孢侧耳;形态学;ITS;生物学特性

**中图分类号:**S 646.1<sup>+</sup>4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)24-0182-07

紫孢侧耳(*Pleurotus sapidus* (Schulz.) Sacc.)属担子菌门(Basidiomycota)、蘑菇目(Agaricales)、侧耳科(Pleurotaceae)、侧耳属(*Pleurotus*),又名美味侧耳<sup>[1-4]</sup>、美味北风菌、美味平菇<sup>[2-3]</sup>,野生菌株生长在春秋季节的阔叶树林

的枯木上,在我国大部分地区都有分布。具有营养丰富、口味鲜美、抗病性强、生长旺盛、生长周期短的特点,目前已基本实现了人工土法栽培<sup>[2,5]</sup>。紫孢侧耳是一种具有重要市场前景的食用菌品种,随着食用菌产业的快速发展,培育和驯化优良的食用菌品种是产业发展的关键。但是由于受紫孢侧耳培养条件的限制,一定程度上制约了其产业化和规模化发展。

该研究以形态学鉴定为基础,辅以基因片段对野外采集到的一个侧耳属菌株进行鉴定,采用ITS序列克隆和分析,并结合传统形态学研究对其进行分类鉴定,通过单因素试验确定该菌株的生物学特性。为野生食用菌尽快实现人工驯化栽培、野生菌种的保育、菌物资源的可持续发展并提供了资源和技术支持<sup>[6-7]</sup>,以期野生紫孢侧耳的产业化、规模化发展提供参考依据。

**第一作者简介:**宋冰(1980-),男,博士,讲师,研究方向为食药菌栽培育种。E-mail:song19800123@126.com.

**责任作者:**李玉(1944-),男,博士,教授,中国工程院院士,研究方向为菌物学。E-mail:yuli966@126.com.

**基金项目:**公益性行业(农业)科研专项资助项目(201503137);国家重点研发计划资助项目(2017YFD0601002);高等学校学科创新引智计划资助项目(D17014);国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2014CB138305);吉林省秸秆综合利用技术创新平台资助项目(吉高平合字[2014]C-1);长春市科技局资助项目(15SS11)。

**收稿日期:**2017-07-26

**Abstract:** This study introduced detailed the specific content of the standard that the verification of genuineness for spawn of *Auricularia heimuer* by SRAP. This standard provided not only a scientifically effective and easy-to-use method for the verification of genuineness for spawn, but also an effective way for breeders to protect intellectual property rights.

**Keywords:** *Auricularia heimuer*; spawn; verification of genuineness; SRAP