

马杰, 屈雯, 陈春艳, 等. 基于转录组序列的羊肚菌 EST-SSR 标记开发与遗传多样性分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(5): 1282-1290.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.05.027

基于转录组序列的羊肚菌 EST-SSR 标记开发与遗传多样性分析

马杰^{1,2}, 屈雯², 陈春艳¹, 王磊², 马维¹, 刘针杉², 马俊¹, 杨珊¹, 丁丽³, 高强⁴, 孙勃²

(1. 毕节市农业科学研究所, 贵州 毕节 551700; 2. 四川农业大学园艺学院, 四川 成都 611130; 3. 毕节市职业技术学院, 贵州 毕节 551700; 4. 毕节市植保站, 贵州 毕节 551700)

摘要: 利用羊肚菌(*Morchella* spp.) 转录组数据开发 EST-SSR(表达序列标签-简单重复序列)标记, 并对 33 份羊肚菌材料进行遗传多样性分析。结果表明, 转录组测序共获得 73 781 条 Unigene 序列, 其中 25 461 条 Unigene 序列中含有 41 814 个简单重复序列(Simple sequence repeats, SSR)位点, SSR 位点发生频率为 34.51%, 平均分布距离为 2.51 kb。优势重复序列类型为单核苷酸, 占总 SSR 位点数量的 51.39%, 其次为三核苷酸和二核苷酸, 分别占总 SSR 位点数量的 28.04% 和 13.35%。A/T、AG/TC、AGC/TCG 分别是单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸的优势重复基元。以 33 份羊肚菌和 1 份酵母菌为材料, 从 61 对 SSR 引物中筛选出 15 对多态性引物, 经扩增得到 130 条多态性条带, 多态性比例为 100%。遗传多样性分析结果显示, 平均每个位点的等位基因数(N_e)为 4.866 7 个, 平均有效等位基因数(N_e)为 2.124 2 个, 平均多样性指数(I)为 0.958 3, 平均观察杂合度(H_o)为 0.191 1, 平均期望杂合度(H_e)为 0.495 1, 平均 Nei's 基因多样性指数为 0.483 5, 表明筛选出的 15 对 SSR 引物的扩增产物具有较好的遗传多样性。通过非加权组平均法(Unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)聚类分析, 可将 33 份羊肚菌材料分为 4 类。试验结果可为羊肚菌的种质资源鉴定、品种鉴别和分子标记辅助育种等研究提供依据。

关键词: 羊肚菌; 分子标记; EST-SSR; 转录组; 遗传多样性

中图分类号: S646.701 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)05-1282-09

Development of EST-SSR markers based on transcriptome sequencing of *Morchella* spp. and its genetic diversity analysis

MA Jie^{1,2}, QU Wen², CHEN Chun-yan¹, WANG Lei², MA Wei¹, LIU Zhen-shan², MA Jun¹, YANG Shan¹, DING Li³, GAO Qiang⁴, SUN Bo²

(1. Bijie Institute of Agricultural Sciences, Bijie 551700, China; 2. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 3. Bijie Vocational and Technical College, Bijie 551700, China; 4. Plant Protection Station of Bijie City, Bijie 551700, China)

收稿日期: 2020-03-31

基金项目: 贵州省科技厅项目(黔科合支撑[2016]2598-1 号); 贵州省人才办项目(RCJD2020-7); 中央补助地方科技基础条件专项(黔科合条中补地[2015]4003); 毕节市科技局项目(毕科联合字 zy[2019]1 号、毕科合字[2017]46 号)

作者简介: 马杰(1981-), 男, 山西大同人, 硕士, 高级农艺师, 研究方向为食用菌种质资源与栽培技术研究。(Tel) 0857-8333150; (E-mail) 115705717@qq.com

通讯作者: 孙勃, (E-mail) bsun@sicau.edu.cn

Abstract: Expressed sequence tag-simple sequence repeat (EST-SSR) markers were developed using transcriptome data of *Morchella* spp., and the genetic diversities of 33 varieties of *Morchella* spp. were analyzed. The results showed that a total of 73 781 Unigene sequences were obtained using transcriptome sequencing. There were 41 814 simple sequence repeats (SSR) loci in 25 461 Unigene sequences, the occurrence frequency of SSR locus

was 34.51%, the average distribution distance was 2.51 kb. Single nucleotide was the advantage repetitive sequence type, which accounted for 51.39% of the total SSR loci, followed by tri-nucleotides and di-nucleotides, which accounted for 28.04% and 13.35%, respectively. A/T, AG/TC, AGC/TCG were the predominant repetitive motifs in single nucleotides, di-nucleotides, tri-nucleotides, respectively. 15 pairs of polymorphic primers were selected from 61 pairs of SSR primers, using 33 varieties of *Morchella* spp. and one variety of yeast as material. 130 polymorphic bands were obtained through amplification, with a polymorphic rate of 100%. Results of genetic diversity analysis showed that the average number of alleles (N_a) was 4.866 7, the average number of effective alleles (N_e) was 2.124 2, the average diversity index (I) was 0.958 3, the average observed heterozygosity (H_o) was 0.191 1, the average expected heterozygosity (H_e) was 0.495 1, and the average Nei's gene diversity index was 0.483 5, indicating that the amplified products of the selected 15 pairs of SSR primers had a good genetic diversity. 33 varieties of *Morchella* spp. could be divided into four groups by unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) cluster analysis. The results can provide basis for germplasm resources identification, variety identification and molecular marker assisted breeding of *Morchella* spp.

Key words: *Morchella* spp.; molecular marker; expressed sequence tag-simple sequence repeats (EST-SSR); transcriptome; genetic diversity

羊肚菌(*Morchella* spp.)属于子囊菌门(Ascomycota),盘菌纲(Pezizomycetes),盘菌目(Pezizales),羊肚菌科(Morchellaceae),羊肚菌属(*Morchella*),由于其菌盖表面凹凸不平,形如羊肚,故名羊肚菌^[1]。羊肚菌肉质脆嫩、风味独特、味道鲜美、营养丰富^[2],在全球范围内主要分布在法国、德国、美国、印度、中国等地,在中国主要分布在中西部地区,如贵州、云南、四川等地。

简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR),又称微卫星 DNA(Microsatellite DNA),是一类由 16 个碱基组成的基序串联重复而成的 DNA 序列^[3]。SSR 因具有共显性、数量丰富、多态性高、重复性好、易检测、操作简单等优点^[4]而被广泛应用于植物遗传多样性分析^[5]、遗传图谱构建^[6]及亲缘关系研究^[7]等领域。根据 SSR 的来源不同,可以将其分为基因组 SSR 和 EST(Expressed sequence tag, EST,表达序列标签)-SSR 两大类型,与基因组 SSR 标记相比,由于 EST-SSR 是基于 EST 序列开发的,来源于表达的基因组区域,可以直接反映相关基因的多样性,因而在不同物种之间具有良好的通用性^[8-10]。此外,由于转录组序列多集中在功能基因上,因此基于转录组数据开发的 SSR 标记有利于后期与重要农艺性状进行关联分析,从而为分子标记辅助育种节约时间和成本。

目前,EST-SSR 在蔬菜^[7]、果树^[11]、花卉^[12]等许多植物中都有应用,但尚未见将其应用于羊肚菌的相关报道。本研究利用转录组数据开发出羊肚菌 EST-SSR 标记,并对其多样性进行分析,旨在筛选适合羊

肚菌 SSR 标记分析的核心引物,为羊肚菌种质资源遗传多样性评价和亲缘关系分析提供引物。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验采集了 33 份羊肚菌材料和 1 份酵母菌材料作为提取 DNA 模板的原材料,材料的相关信息见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 转录组测序 采集不同品种羊肚菌的各组织,进行等量混合后送至北京诺禾致源公司进行转录组测序。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 采集各个材料样品,用液氮冷冻后研磨,采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取样品的基因组 DNA^[13],并于 -20 ℃ 储存备用,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。

1.2.3 引物设计与合成 采用 MISA 软件(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>)对羊肚菌转录组的 Unigene 基因进行搜索。分别设定单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸的最少重复搜索次数为 10 次、6 次、5 次、5 次、5 次、5 次。用 Primer 3 进行引物设计,引物序列长度为 18~27 bp,预计扩增产物长度为 100~300 bp, G+C 含量为 40%~60%,退火温度为 54~61 ℃。随机挑选出设计的 61 对引物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

1.2.4 PCR 扩增及检测 20 μl PCR 反应体系如下:1 μl DNA 模板,10 μl 2×EasyTaq PCR SuperMix

for PAGE, 各 1 μl 上游、下游引物, 用去离子水补足体积至 20 μl 。PCR 反应扩增条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 49~54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$

延伸 15 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。初筛用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 复筛用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

表 1 供试材料的基本信息

Table 1 Basic information of the tested materials

序号	样品编号	种类	产地	菌盖形状	菌盖颜色
1	GLBS	地方野生种	吉林省白山市	桃尖形	浅棕色
2	SXZQ	地方野生种	山西省左权县	塔尖形	灰白色
3	SXHZ	地方野生种	陕西省汉中市	圆柱形或者卵圆形	棕色
4	SCGZ	地方野生种	四川省甘孜市	圆锥形或者宽圆锥形	棕褐色
5	YNBS-1	地方野生种	云南省保山市	圆锥形或者卵圆形	赤褐色
6	HBXY	地方野生种	湖北省襄阳市	塔尖形	浅棕色
7	YNBS-2	地方野生种	云南省保山市	塔尖形	浅棕色
8	GZGY-1	人工栽培种	贵州省贵阳市	塔尖形	浅棕色至黑色
9	GZGY-2	人工栽培种	贵州省贵阳市	塔尖形	浅棕色至黑色
10	GZGY-3	人工栽培种	贵州省贵阳市	塔尖形	浅棕色至黑色
11	GZGY-4	人工栽培种	贵州省贵阳市	塔尖形	浅棕色至黑色
12	GZGY-5	人工栽培种	贵州省贵阳市	塔尖形	浅棕色至黑色
13	GZGY-6	人工栽培种	贵州省贵阳市	塔尖形	浅棕色至黑色
14	SCCD-1	人工栽培种	四川省成都市	圆锥形或者宽圆锥形	棕灰色
15	SCCD-2	人工栽培种	四川省成都市	圆锥形或者宽圆锥形	棕灰色
16	SCCD-3	人工栽培种	四川省成都市	圆锥形或者宽圆锥形	棕灰色
17	SCCD-4	人工栽培种	四川省成都市	圆锥形或者宽圆锥形	棕灰色
18	SCCD-5	人工栽培种	四川省成都市	圆锥形或者宽圆锥形	棕灰色
19	YNKM-1	人工栽培种	云南省昆明市	塔尖形	灰棕色
20	YNKM-2	人工栽培种	云南省昆明市	塔尖形	灰棕色
21	YNKM-3	人工栽培种	云南省昆明市	塔尖形	灰棕色
22	YNKM-4	人工栽培种	云南省昆明市	塔尖形	灰棕色
23	GZBJ-1	地方野生种	贵州省毕节市	近圆锥形	棕褐色至棕色
24	GZBJ-2	地方野生种	贵州省毕节市	塔尖形	棕褐色至棕色
25	GZBJ-3	地方野生种	贵州省毕节市	锥形或者卵圆形	黑色
26	GZBJ-4	地方野生种	贵州省毕节市	塔尖形	棕色
27	GZBJ-5	地方野生种	贵州省毕节市	塔尖形	黑褐色
28	GZBJ-6	地方野生种	贵州省毕节市	球形	棕色
29	GZBJ-7	地方野生种	贵州省毕节市	塔尖形	棕褐色
30	GZBJ-8	地方野生种	贵州省毕节市	梭形	浅棕色
31	GZBJ-9	地方野生种	贵州省毕节市	球形	灰白色
32	GZBJ-10	地方野生种	贵州省毕节市	球形	浅黄色
33	GZBJ-11	地方野生种	贵州省毕节市	塔尖形	黑色
34	-	商品酵母菌	江苏省高邮市	-	-

“-”表示无相关信息。

1.2.5 数据统计 采用人工读带的方法,将聚丙烯酰胺凝胶电泳图上可重复的清晰条带的记为“1”,在同一位置条带较弱或无条带的记为“0”,由此建立原始数据矩阵。用 POPGENE 1.31 和 PIC-CALC 软件进行 SSR 位点的遗传多样性分析,用 NTSYS-PC 1.0 软件进行供试材料的聚类分析。

2 结果与分析

2.1 羊肚菌转录组中 SSR 位点的分布及特点

通过对羊肚菌的 73 781 条 Unigene 序列(总长度约为 104 910 kb)进行搜索发现,在 25 461 条 Unigene 序列中含有 41 814 个 SSR 位点,其中 7 306 条

Unigene 含有 2 个或 2 个以上 SSR 位点。整体上看,SSR 位点的发生频率为 34.51%,即平均每 2.51 kb 出现 1 个 SSR。单核苷酸重复是主要类型,占总 SSR 位点数的 51.39%;其次是二核苷酸重复、三核苷酸重复,分别占总 SSR 位点数的 13.35%、28.04%;四核苷酸重复、五核苷酸重复和六核苷酸重复类型数量较少,分别占总 SSR 位点数的 4.56%、1.10%和 1.56%。在所有 SSR 位点中,重复 10 次的 SSR 位点数最多,共有 6 658 个,占总数的 15.92%;重复 5 次的 SSR 位点数次之,共有 6 396 个,占总数的 15.30%;重复 6 次的 SSR 位点共有 5 426 个,占总数的 12.98%(表 2)。

表 2 羊肚菌 SSR 的类型、数量及分布比例

Table 2 Type, number and distribution ratio of simple sequence repeats(SSR) in *Morchella* spp.

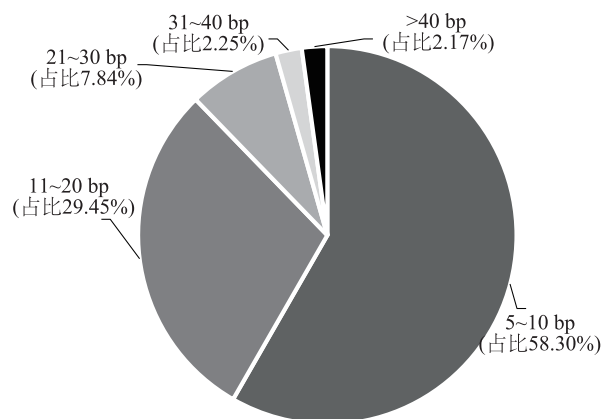
重复单元	不同重复次数的 SSR 位点数(个)								合计 SSR 位点数(个)	比例(%)
	5 次	6 次	7 次	8 次	9 次	10 次	11~20 次	>20 次		
单核苷酸	0	0	0	0	0	5 909	10 585	4 996	21 490	51.39
二核苷酸	0	2 220	1 007	619	461	303	883	88	5 581	13.35
三核苷酸	4 905	2 475	1 562	1 292	402	366	688	34	11 724	28.04
四核苷酸	905	484	194	96	69	54	98	6	1 906	4.56
五核苷酸	322	59	30	18	8	8	16	0	461	1.10
六核苷酸	264	188	70	32	37	18	43	0	652	1.56
合计	6 396	5 426	2 863	2 057	977	6 658	12 313	5 124	41 814	100.00

重复次数为 11~20 次时,各重复次数下的 SSR 位点数均低于重复 10 次的。

羊肚菌的平均 SSR 位点长度为 18.63 bp,其中六核苷酸重复序列的平均长度最长,达到 38.94 bp。羊肚菌的 SSR 长度范围为 5~114 bp,其中长度为 5~10 bp 的重复序列数最多,共有 24 377 个,占总 SSR 位点数的 58.30%;长度为 11~20 bp 的重复序列数次之,共有 12 313 个,占总 SSR 位点数的 29.45%;长度大于 40 bp 的重复序列数最少,仅占总 SSR 位点数的 2.17%(图 1)。

2.2 羊肚菌转录组 SSR 基序重复类型和频率特征

从羊肚菌转录组 SSR 核苷酸基序的类型看,41 814 个 SSR 位点包含 219 种重复单元,单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸重复类型分别有 2 种、4 种、10 种、30 种、57 种、116 种,其中单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸重复类型数量最多,共占总 SSR 数的 92.78%。从分布来看,出现最多的单元是 A/T(12 022 个,占 28.75%),其次是 C/G(9 468 个,占 22.64%)和 AGC/TCG(2 749 个,占



括号外数据为 SSR 长度,括号内数据为 SSR 数量占比。

图 1 羊肚菌 SSR 重复长度的分布比例

Fig.1 Distribution ratio of the repeat length of simple sequence repeats(SSR) in *Morchella* spp.

6.57%)。在单核苷酸重复单元中,以 A/T 为主,占单核苷酸总重复数的 55.94%;在二核苷酸重复单元中,

以 AG/TC 和 AC/TG 为主,占二核苷酸总重复数的 82.21%;在三核苷酸重复基元中,AGC/TCG、ACC/

TGG、AGG/TCC 的数量较多,分别占三核苷酸总重复数的 23.45%、18.50%、17.14%(表 3)。

表 3 羊肚菌 SSR 中单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸重复基元的类型、数量及比例

Table 3 Type, number and ratio of mononucleotide, dinucleotide and trinucleotide repeat motifs in simple sequence repeats (SSR) of *Morchella* spp.

重复基元	不同重复次数的 SSR 位点数(个)								合计 SSR 位点数(个)	比例 (%)
	5 次	6 次	7 次	8 次	9 次	10 次	11~20 次	>20 次		
A/T						4 441	5 728	1 853	12 022	28.75
C/G						1 468	4 857	3 143	9 468	22.64
AC/TG		700	388	255	193	115	441	38	2 130	5.09
AG/TC		964	413	273	211	147	400	50	2 458	5.88
AT/TA		475	188	79	56	41	42		881	2.11
CG/GC		81	18	12	1				112	0.27
AAC/TTG	186	65	34	34	9	5	6		339	0.81
AAG/TTC	508	256	116	100	37	31	120	2	1 170	2.80
AAT/TTA	179	27	16	16	2	6			246	0.59
ACC/TGG	849	456	343	289	59	65	108		2 169	5.19
ACG/TGC	263	105	60	38	34	10	12		522	1.25
ACT/TGA	218	154	87	43	36	61	97	26	722	1.73
AGC/TCG	1 044	562	391	348	115	111	177	1	2 749	6.57
AGG/TCC	771	421	280	265	72	64	134	2	2 009	4.80
ATC/TAG	311	143	73	55	11	7	25	1	626	1.50
CCG/GGC	576	286	162	104	27	6	9	2	1 172	2.80
合计	4 905	4 695	2 569	1 911	863	6 578	12 156	5 118	38 795	92.78

2.3 核心引物的筛选及通用性检测

随机挑选 61 对 SSR 引物,以 YNBS-1、YNBS-2、YNKM-1 等 3 份羊肚菌为材料对引物进行初步筛选。结果表明,有 45 对引物可扩增出条带,占引物总数的 73.77%,表明引物设计较为合理。利用 7 个地区的 11 份不同种类的羊肚菌材料(GZBJ-1、GZBJ-4、GZBJ-10、GZBJ-11、GZGY-1、SCCD-1、YNBS-1、YNBS-2、YNKM-1、SXZQ、GLBS)进行复筛,共得到 25 对具有多态性的引物,占复筛引物数的 55.56%,占总引物数的 40.98%。之后用 33 份羊肚菌材料进行第 3 次筛选,并用 1 份商品酵母菌进行通用性检测,部分引物(M3-9、M4-9、M3-10、M3-13)第 3 次筛选得到的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 2。最终筛选出 15 对多态性好、带型清晰的羊肚菌 SSR 引物,占总引物数的 24.59%(表 4)。用 15 对核心引物共扩增出 130 条条带,所有条带均有多态

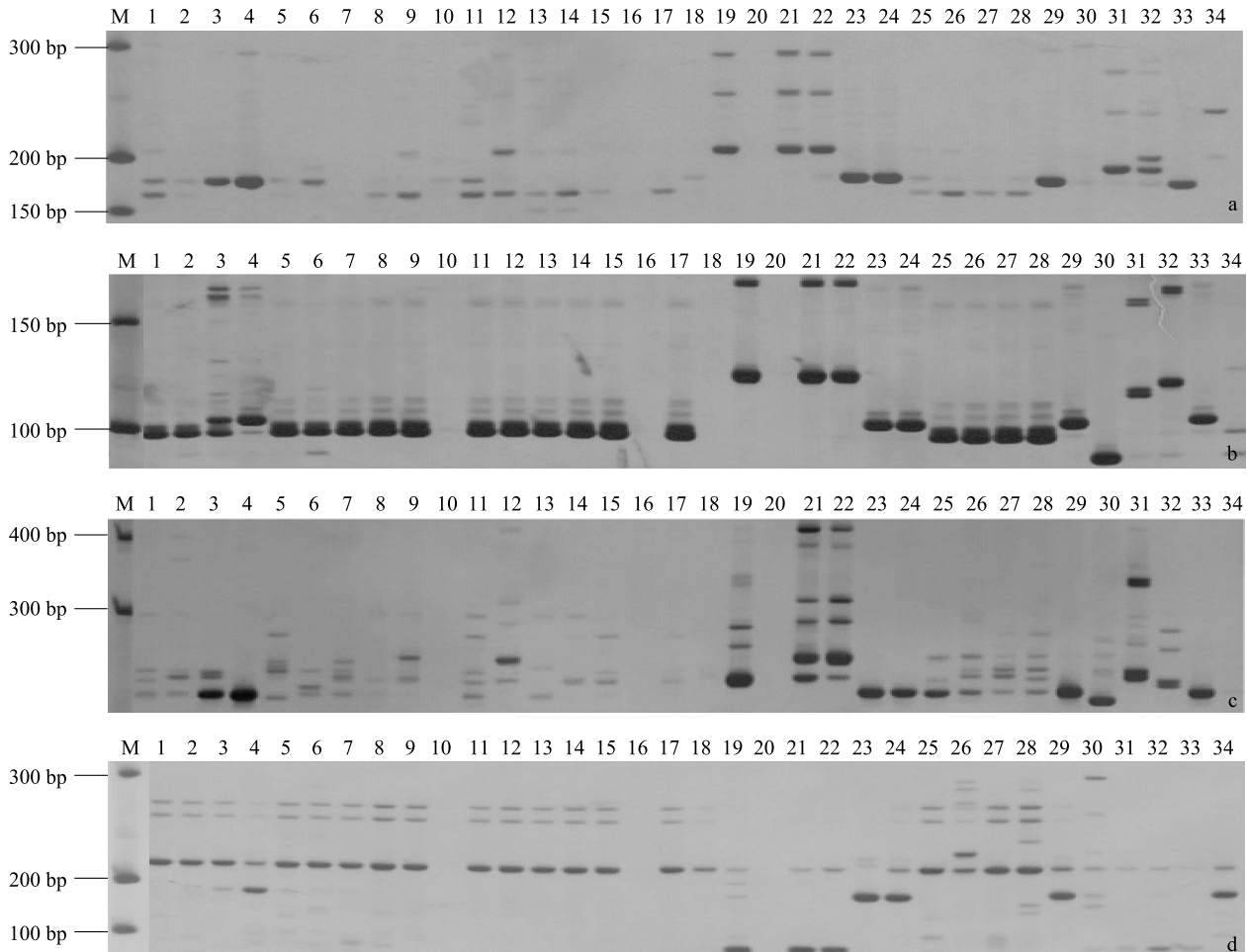
性。平均每对引物扩增出 8.67 条条带,扩增条带数最多的引物是 M4-19(22 条),最少的引物是 M4-7(2 条)和 M3-8(2 条)。此外,本研究结果显示,15 对引物中有 6 对引物在酵母菌中可以扩增出条带,表明这些引物在酵母菌中具有一定的通用性。

2.4 遗传多样性分析

15 对 SSR 核心引物在 33 份羊肚菌材料和酵母菌之间共扩增获得 73.000 0 个等位基因,每个位点的等位基因数(N_a)为 2.000 0~7.000 0 个,平均每个位点的等位基因数为 4.866 7 个,平均有效等位基因数为 2.124 2 个,有效等位基因变异率(有效等位基因数占观测等位基因数的比例)为 43.65%,其中引物 M4-14、M2-11 等位基因数最多,均为 7.000 0 个,引物 M3-9 的有效等位基因数最多,为 3.555 6 个(表 5)。当有效等位基因数低于观测的等位基因数时,说明在基因组中存在一

些高频率的等位基因。由表 5 还可以看出,平均多样性指数(I)为0.958 3,最小 I 对应的引物是 M4-7,最大 I 对应的引物是 M3-9, I 的变化范围为0.198 5~1.448 6;观察杂合度(H_o)的变化范围为0~0.608 7,平均为0.191 1;平均期望杂合度(H_e)为0.495 1,最小值为0.097 4,最大值为0.737 2;Nei's 期望杂合度的变化范围为0.095 0~0.718 8,

平均为0.483 5;多态性信息含量(PI)为0.277 1~0.673 9,平均为0.447 0,其中 8 对引物属于 SSR 位点多态性信息含量大于0.500 0的高多态性引物,占随机挑选引物总数的 13.11%。以上结果表明,本研究获得的 15 对引物扩增的 SSR 位点丰富,能够揭示 33 份羊肚菌材料的遗传多样性,并在同属于真菌的酵母菌中得到了有效扩增。



a;引物 M3-9;b;引物 M4-9;c 引物 M3-10;d;引物 M3-13;M;marker;序号 1~34 同表 1。

图 2 部分引物在 33 份羊肚菌材料中的复筛电泳结果

Fig.2 Results of secondary screening electrophoresis of partial primers in 33 *Morchella* spp. materials

2.5 聚类分析

根据 15 对核心引物扩增数据,采用非加权组平均法(Unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA)对 33 个羊肚菌供试材料进行聚类分析。由图 3 可以看出,33 个供试羊肚菌材料相似系数为0.70~0.99,表明这些材料的遗传背景较为相似。其中,SCCD-3 与 YNKM-2 之间的相似系数最大(0.99),表明两者间的亲缘关系最近。在遗传相

似系数为 0.77 处可将供试材料分为四大类,其中第 I 类、第 II 类分别只有 2 份材料;第 III 类材料数较多,共有 13 份,来自贵州毕节的 GZBJ-1 与 GZBJ-2 聚在 1 个小支上,与 GZBJ-8、GZBJ-9、GZBJ-10 材料分开,来自云南昆明的 YNKM-1、YNKM-3、YNKM-4 材料聚在 1 个小支上,而 YNKM-2 则聚在另 1 个小支上;第 IV 类中的 GZBJ-4 独立于其他材料,大部分来自贵州贵阳和四川成都的材料都聚在同一个小支

上,除云南、贵州、四川以外其他省份的材料则聚在 另 1 个小支上。

表 4 羊肚菌 SSR 核心引物序列与扩增信息

Table 4 Core primer sequences and amplification information of simple sequence repeats (SSR) in *Morchella* spp.

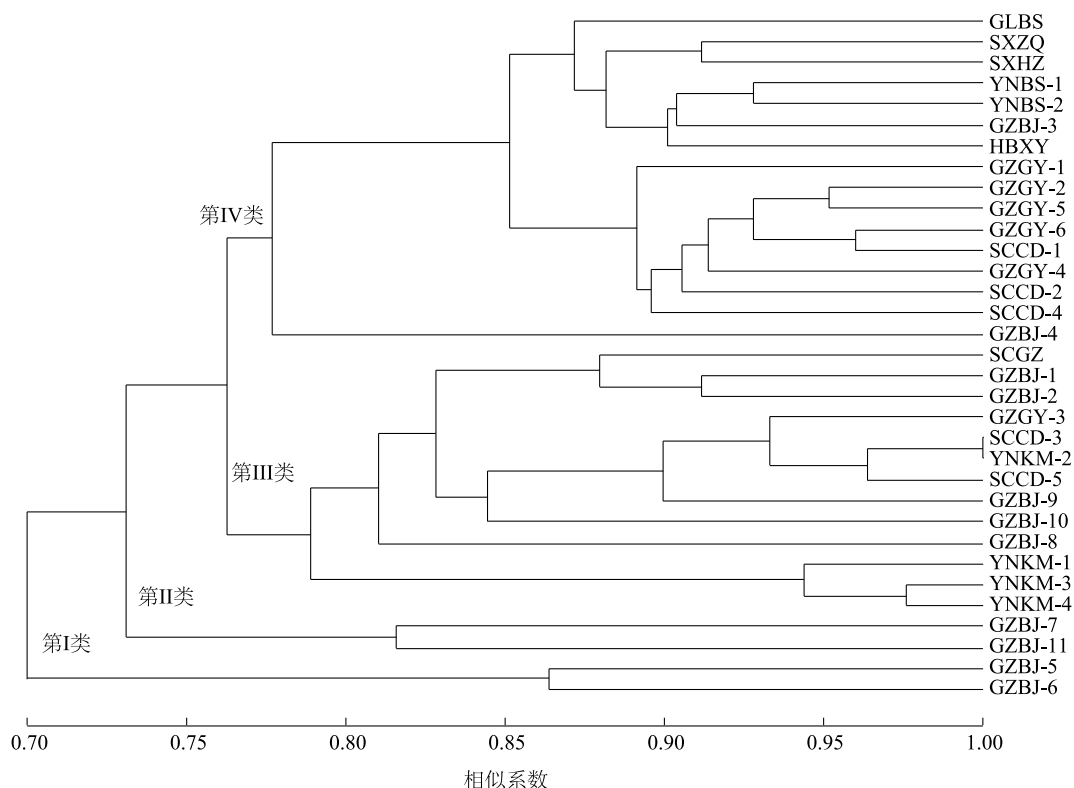
序号	引物 编号	引物序列		重复单元	退火 温度 (℃)	预期产 物大小 (bp)	扩增 条带数 (条)	多态性 带数 (条)	多态性 比例 (%)
		正向 (5'→3')	反向 (5'→3')						
1	M3-10	CTGCTCCCCCTCATCTACCT	CGGTGAGATGAGTAGCCGAC	(TTC) ₁₇	60.105	245	10	10	100
2	M3-13	GCGACAGATCCAGAGACTCG	GTGGTGGTGGTGCCTGATAA	(CAC) ₁₅	59.971	205	13	13	100
3	M4-9	GCACACGGTCAAGGATAGCT	GACGACCTTCCAGTAACGCA	(TGTA) ₁₁	60.108	238	5	5	100
4	M4-1	AAGGTTGTTGTTGGGTGGGT	AAGAGAAGTGTGTAGCGGGC	(CTGC) ₁₅	59.958	185	12	12	100
5	M4-8	GCAAAGAGCAAGCCTAAGCC	TCATGCAGCACCAATCCCTT	(TGGA) ₁₁	59.828	254	5	5	100
6	M4-14	GTGGATGAGCTGCTTGGTCT	CTCACCTCCCTTCTCCCTCA	(TGGA) ₁₁	60.036	275	12	12	100
7	M4-19	TTCGGCAGACACAGACAGTC	GAGAGGACGAGAGGACGAGA	(CCAT) ₁₁	59.968	269	22	22	100
8	M2-9	CGGACGGAATAACCCTGGTC	GAGCGAATGAACTTGGCTCG	(AC) ₁₈	60.179	275	4	4	100
9	M3-9	CGTGACGTTGAGATTGTGG	GAAGCCCATTTCTATCCGCT	(GAG) ₁₅	60.111	205	12	12	100
10	M4-7	GAGGTGAGGTGAGGGAGGAT	GATACGATACGAGGCGGTCC	(TGTC) ₁₅	60.032	278	2	2	100
11	M2-11	CTCCACTTCCAGGGCCAAAA	TCAGTTGATCTCCTCGCAGC	(AG) ₁₉	60.179	224	14	14	100
12	M3-14	GCGGATCACTGCTACGAGAA	TCGACTCTGTAGGCTGGTGA	(TAC) ₁₈	59.899	189	11	11	100
13	M3-3	ATAGCCGATGGAGAAGCACC	AAAACCTGAAAACCGCCGGG	(GAT) ₁₇	59.967	204	3	3	100
14	M3-8	CGACGGGTAAGTAACGTGCA	TGTCTCGCTTCCACAAACA	(GAA) ₁₅	60.387	195	2	2	100
15	M3-16	GGCGGTTTCGAGCACTAGAA	CCCTGCCCTCCCTAGAAGAA	(ACT) ₂₀	60.389	246	3	3	100

表 5 15 对羊肚菌 SSR 核心引物扩增的等位基因的遗传参数

Table 5 Genetic parameters of alleles amplified by 15 pairs of simple sequence repeats (SSR) core primers in *Morchella* spp.

引物编号	观测等位 基因数(个)	有效等位 基因数(个)	多样性指数 (<i>I</i>)	观察杂合度 (<i>H_o</i>)	期望杂合度 (<i>H_e</i>)	Nei's 期望 杂合度	多态性信息 含量 (<i>PI</i> C)
M3-10	5.000 0	2.864 4	1.303 9	0.153 8	0.676 9	0.650 9	0.614 2
M3-13	4.000 0	1.603 4	0.736 3	0.172 4	0.382 9	0.376 3	0.349 9
M4-9	5.000 0	2.372 4	1.125 6	0.034 5	0.588 6	0.578 5	0.535 1
M4-1	6.000 0	1.565 1	0.788 5	0.258 1	0.367 0	0.361 1	0.343 1
M4-8	5.000 0	1.596 3	0.795 0	0.250 0	0.379 5	0.373 5	0.353 8
M4-14	7.000 0	2.260 7	1.122 0	0.608 7	0.570 0	0.557 7	0.503 7
M4-19	5.000 0	2.994 2	1.310 3	0.375 0	0.687 5	0.666 0	0.621 0
M2-9	5.000 0	1.521 9	0.685 9	0.407 4	0.349 4	0.342 9	0.313 6
M3-9	6.000 0	3.555 6	1.448 6	0.150 0	0.737 2	0.718 8	0.673 9
M4-7	2.000 0	1.105 0	0.198 5	0.100 0	0.097 4	0.095 0	0.090 5
M2-11	7.000 0	2.466 8	1.284 2	0.250 0	0.607 3	0.594 6	0.564 3
M3-14	6.000 0	2.227 7	1.131 8	0.066 7	0.560 5	0.551 1	0.512 1
M3-3	3.000 0	2.049 6	0.873 9	0	0.527 6	0.512 1	0.452 6
M3-8	2.000 0	1.497 9	0.514 7	0	0.341 4	0.332 4	0.277 1
M3-16	5.000 0	2.181 5	1.055 7	0.040 0	0.552 7	0.541 6	0.500 5
平均	4.866 7	2.124 2	0.958 3	0.191 1	0.495 1	0.483 5	0.447 0
标准差(<i>SD</i>)	1.552 3	0.666 9	0.342 7	0.172 0	0.171 1	0.165 7	0.151 5

引物编号同表 4。



样品编号同表 1。

图 3 33 份羊肚菌材料 SSR 标记的聚类分析结果

Fig.3 Cluster analysis result of SSR markers in 33 *Morchella* spp.

3 讨论

本研究利用羊肚菌转录组数据,在 73 781 条 Unigene 序列中进行检索,发现 25 461 条 Unigene 序列中含有 41 814 个 SSR 位点,平均每 2.51 kb 出现 1 个 SSR 位点,发生频率为 34.51%,明显高于黑松露的 3.42%^[14]、灰树花的 3.42%^[15] 及杏鲍菇的 8.31%^[16],并且高于小海绵羊肚菌的 19.90%^[17]。以上研究结果表明,虽然同为食用真菌,但是羊肚菌的 SSR 位点分布更丰富,这与不同物种之间 SSR 位点的真实含量差异及搜索方法、搜索条件不同有着密切关联。羊肚菌转录组中 SSR 位点的种类比较丰富,从单核苷酸到六核苷酸都有,其中单核苷酸数最多(占总 SSR 数的 51.39%),其次为三核苷酸数(占总 SSR 数的 28.04%)。这一现象与在粗柄羊肚菌^[18]、小海绵羊肚菌^[17]、蒙古白丽蘑^[19] 和杏鲍菇^[16] 中的研究结果一致,表明由羊肚菌转录组序列开发的 SSR 位点具有偏好性,单核苷酸和三核苷酸类型的 SSR 较为稳定。然而灰树花^[15]、杨树锈

菌^[20]、金针菇^[21]、牛肝菌^[22] 中的 SSR 位点类型以三核苷酸为主,在黑松露^[14]、灵芝^[23] 中以六核苷酸为主,表明不同食用真菌之间 SSR 位点类型差异很大,这可能与物种的特异性有关。

在本试验中,利用 15 对 SSR 引物对来自 7 个省份的 33 份羊肚菌材料和 1 份酵母菌材料进行 PCR 扩增,结果表明,扩增条带的多态性比例为 100.0%,高于黑木耳(95.5%)^[24]、野生香菇(95.9%)^[25]、真姬菇(81.2%)^[26]。15 对 SSR 引物扩增产物的遗传多样性分析结果表明,这些羊肚菌材料具有丰富的遗传多样性。徐锐^[25] 利用 34 对高多态性引物对 94 个香菇菌株进行遗传多样性分析,结果表明, I 、 H_o 、 PIC 的平均值分别是 0.89、0.24、0.40。张跃新等^[24] 研究发现,黑木耳 SSR 标记的平均 PIC 、 I 分别为 0.216、0.455,这些结果都略低于本试验结果,表明本试验开发的羊肚菌的 SSR 多态性较好。一些真菌的遗传多样性高于本试验结果,如灰树花的平均 PIC 为 0.52^[15],金针菇的平均 PIC 为 0.801 9^[21],这些现象可能与物种的差异有关。本

研究通过对33份羊肚菌材料进行聚类分析,结果共分为4大类,来自贵州毕节的11个材料在这4类中均有分布,说明这些来自贵州毕节的羊肚菌材料受所在地区羊肚菌基因渗透的影响较小。而来自云南昆明、贵州贵阳和四川成都的大部分材料都各自聚类在同一小组,说明这些材料在区域内没有发生明显的遗传分化,由此表明聚类分析结果与地理位置有一定关系。

4 结论

本研究基于转录组数据成功开发了羊肚菌 SSR 位点,共筛选获得15对核心引物,并将其成功应用于33个羊肚菌的遗传多样性和聚类分析中。研究结果丰富了羊肚菌 EST-SSR 标记引物库,为今后羊肚菌的种质资源鉴定、物种鉴别、分子标记辅助育种、亲缘关系分析等研究提供了引物支持和实践参考。

参考文献:

- [1] 谢占玲,谢占青. 羊肚菌研究综述[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2007, 25(2): 36-40.
- [2] 倪淑君,张海峰. 我国羊肚菌的产业发展[J]. 北方园艺, 2019(2): 165-167.
- [3] 杨梦婷,黄洲,干建平,等. SSR 分子标记的研究进展[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2019, 18(4): 429-436.
- [4] GARCIA-LOR A, CURK F, SNOUSSE-TRIFA H, et al. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the 'true citrus fruit trees' group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species[J]. Annals of Botany, 2013, 111(1): 1-19.
- [5] 苏一钧,王娇,霍恺森,等. 甘薯引进种 SSR 遗传多样性分析[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(5): 984-997.
- [6] BHATTACHARJEE M, PRAKASH S H, ROY S, et al. SSR-based DNA fingerprinting of 18 elite Indian varieties of sesame (*Sesamum indicum* L.)[J]. Nucleus, 2020, 63(1): 67-73.
- [7] 林琨,薛珠政,裴波音,等. SSR 标记在茄子杂交种纯度检验中的应用[J/OL]. 分子植物育种, 2020. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20200310.1700.006.html>.
- [8] 王玲玲,陈东亮,黄丛林,等. SSR 分子标记技术在植物研究中的应用[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(36): 123-126, 130.
- [9] POWELL W, MACHRAY G C, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. Trends in Plant Science, 1996, 1(7): 215-222.
- [10] SCOTT K D, EGGLE P, SEATON G, et al. Analysis of SSRs derived from grape ESTs[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100(5): 723-726.
- [11] 文舜,陈秀萍,郑少泉. 龙眼 EST-SSR 标记开发及无患子科5个属种质遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2019, 46(7): 1359-1372.
- [12] 贺丹,吴芳芳,张佼蕊,等. 牡丹转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1428-1433.
- [13] 孙立夫,张艳华,裴克全. 一种高效提取真菌总 DNA 的方法[J]. 菌物学报, 2009, 28(2): 299-302.
- [14] 李明卫. 大型真菌黑松露 EST-SSR 信息分析[D]. 临安: 浙江农林大学, 2012.
- [15] 杨杨. 灰树花 EST-SSR 引物开发及遗传多样性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [16] 李强,陈诚,熊川,等. 杏鲍菇转录组数据 SSR 位点的生物信息学分析[J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(3): 454-458.
- [17] 孟清,谢占玲,戴大日,等. 青海小海绵羊肚菌 M12-10 转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 青海大学学报, 2019, 37(6): 1-10.
- [18] 刘伟,蔡英丽,何培新. 粗柄羊肚菌转录组的 SSR 分布和序列特征分析[J]. 轻工学报, 2017, 32(2): 33-39.
- [19] 鲁铁. 蒙古白丽蘑的遗传多样性及其保育学研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- [20] 万志兵,王小龙,管宏伟,等. 杨树锈菌表达序列微卫星分析及 EST-SSR 标记开发[J]. 东北林业大学学报, 2012, 40(6): 76-80.
- [21] 金群力,沈颖越,蔡为明,等. 金针菇基因组 SSR 位点分析及标记开发[J]. 食用菌学报, 2016, 23(2): 12-19.
- [22] 王莹,陈明杰,汪虹,等. 美味牛肝菌全基因组 SSR 位点的分布规律研究[J]. 菌物学报, 2015, 34(2): 204-214.
- [23] 徐凯,张劲松,唐传红,等. 灵芝基因组 SSR 位点分布与分析[J]. 上海农业学报, 2014, 30(5): 32-37.
- [24] 张跃新,胡伟,郝艺铭,等. 北方地区黑木耳部分主栽品种与野生菌株遗传多样性 SSR 分析[J]. 中国食用菌, 2019, 38(5): 44-48.
- [25] 徐锐. 野生香菇数量性状与 SSR 分子标记的关联分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [26] 董岩,陈辉,赵明文,等. 真姬菇栽培菌株的 ITS 和 SSR 分析[J]. 上海农业学报, 2009, 25(3): 59-64.

(责任编辑:徐艳)