

纪 伟, 苏文英, 刘晓梅, 等. 连云港地区野生灵芝生物学特性及基因组特征分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(2): 223-232.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.02.004

连云港地区野生灵芝生物学特性及基因组特征分析

纪 伟^{1,2}, 苏文英¹, 刘晓梅¹, 任立凯¹, 胡曙鋈³, 孙潇潇³, 陈克龙²

(1. 连云港市农业科学院, 江苏 连云港 222000; 2. 青海师范大学, 青海 西宁 810000; 3. 连云港市园艺蔬菜指导站, 江苏 连云港 222000)

摘要: 野生灵芝资源在连云港境内有着广泛的分布, 本研究使用全基因组重测序技术对具有不同形态特征和生境特点的灵芝基因组进行测序及分析, 以期解析连云港地区野生灵芝的生物学特性及基因组特征。结果表明, 从不同区域采集的野生灵芝种质资源菌丝具有锁状联合, 具备形成子实体的条件, 生物学特性存在较大差异; 通过主成分分析将 12 株野生灵芝菌株种质资源聚为 3 类, 其中第Ⅲ类具有更丰富的遗传多样性; 比较单核苷酸多态性 (SNP)、插入或者缺失 (InDel) 在 12 株灵芝菌株基因组中的分布情况发现, 第 1 条染色体中的 SNP 最多, 占比为 46.07%, SNP 中转换颠换比 (T_s/T_v) 为 2.03, 说明变异以转换为主, 插入或缺失导致的基因差异在第 1 条染色体上最多, 占总 InDel 数的 44.31%。研究结果说明, 连云港地区灵芝具有丰富的遗传多样性, 可以用于进一步挖掘更多的功能基因和进行品种选育。

关键词: 灵芝; 生物学特性; 全基因组重测序; 主成分分析

中图分类号: S567.3⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)02-0223-10

Analysis of biological characteristics and genomic characteristics of wild *Ganoderma lucidum* in Lianyungang

Ji Wei^{1,2}, Su Wen-ying¹, Liu Xiao-mei¹, Ren Li-kai¹, Hu Shu-yun³, Sun Xiao-xiao³, Chen Ke-long²

(1. Lianyungang Academy of Agricultural Sciences, Lianyungang 222000, China; 2. Qinghai Normal University, Xining 810000, China; 3. Lianyungang Gardening Vegetable Guidance Station, Lianyungang 222000, China)

Abstract: Wild *Ganoderma lucidum* resources are extensively found in Lianyungang. In this study, we utilized whole-genome resequencing technology to examine and analyze the genomes of *Ganoderma lucidum* with different morphological and habitat characteristics. The purpose of this study was to unveil the biological and genomic characteristics of wild *Ganoderma lucidum* in Lianyungang. The results showed that the mycelium of wild *Ganoderma lucidum* germplasm resources collected from different regions had clamp connection, and had the conditions to form fruiting bodies, and the biological characteristics were quite different. Through principal component analysis, 12 wild *Ganoderma lucidum* germplasm resources

were grouped into three categories, and the third category had more abundant genetic diversity. Analyzing the distribution of single nucleotide polymorphism (SNP) and insertion or deletion (InDel) in the genome of 12 strains of *Ganoderma lucidum*, it was found that the number of SNP on chromosome 1 was the largest, accounting for 46.07%, and the conversion and inversion ratio (T_s/T_v) in the SNP was 2.03, indicating that the variation was mainly conversion. The genetic difference caused by insertion or deletion was the highest on chromosome 1, accounting for 44.31%

收稿日期: 2023-02-13

基金项目: 江苏现代农业(蔬菜)产业技术体系[JATS(2022)177];
连云港市财政专项(QNJ2209); 连云港市食用菌全产业链建设项目[连农复(2023)14号]

作者简介: 纪 伟(1989-), 男, 江苏睢宁人, 博士研究生, 高级工程师, 主要从事菌物资源研究与利用工作。(E-mail) jiwei100500@163.com

通讯作者: 任立凯, (E-mail) 2949823@qq.com; 陈克龙, (E-mail) ckl7813@163.com

of the total InDel number. These results showed that *Ganoderma lucidum* in Lianyungang had rich genetic diversity, which could be used to further explore more functional genes and breed varieties.

Key words: *Ganoderma lucidum*; biological characteristics; whole genome resequencing; principal component analysis

灵芝是一种大型药食两用真菌^[1],是驰名中外的珍稀中药材之一^[2],其药理成分丰富,且无毒副作用,有效成分包括灵芝多糖^[3]、多肽^[4]、三萜类^[5]及 16 种氨基酸^[6]等。灵芝能降低中枢神经系统的兴奋性,有一定镇痛作用^[7],此外还有解毒^[8]、降血糖^[9]、抗辐射^[10]、提高免疫力^[11]、治疗哮喘^[12]和抗肿瘤^[13]等作用。灵芝还具有极高的文化观赏价值^[14],可将之培育成外形美观的观赏盆景^[15]。

连云港位于江苏北部,境内山海齐观,河湖、丘陵、滩涂、湿地、海岛俱备^[16],具有丰富的生物多样性,在菌物资源方面,连云港境内已报道的大型真菌资源有 50 余种^[17],其中野生灵芝资源丰富、类型多样,当地村民多采集野生灵芝作为普通农产品或中药材在市场上销售,但相关研究甚少。本研究团队近几年对连云港地区野生灵芝资源开展了一系列育种研究,在采集、鉴定、驯化栽培、栽培条件优化及抗逆等方面做了一部分工作,探索并实践了代料栽培、椴木栽培和近地保护方式的仿野生栽培,但没有科学有效地从遗传学角度选择性地对这部分资源进行

研究、开发和保护,对连云港地区不同区域采集的灵芝资源的生物学特性、基因组特征和遗传多样性尚不清楚。因此,本研究拟选取具有代表性的野生灵芝菌株进行分离、鉴定,对不同菌株间菌落生长速度、液体发酵生物量、液体发酵 pH 值和人工栽培吃料速度等生物学特性进行研究,首次采用全基因组重测序方法对不同灵芝菌株之间基因组特征及遗传多样性进行分析,以期明确其在分子水平上的遗传多态性与亲缘关系,为后期通过分子标注技术与灵芝生物学特性、表型性状评价相结合创造优质种质资源及挖掘关键功能基因提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本项目组于 2022 年 6–9 月在江苏省连云港市范围内采集获得野生灵芝标本,根据形态特征、生境特点选取具有代表性的标本 12 个,野生灵芝标本信息如表 1 所示。将采集的野生灵芝进行组织分离得到菌株,保存于连云港市农业科学院的食用菌菌种库中。

表 1 野生灵芝的标本信息

Table 1 Specimen information of wild *Ganoderma lucidum*

菌株编号	形态特征	生境特点
lynk001	子实体无柄,呈红褐色;菌盖近半圆形,边缘肥厚,呈淡黄色,有轮纹	生于阔叶林中的立木干基部朽木上
lynk002	子实体无柄,呈白色;菌盖边缘不规则,薄,呈淡黄褐色,有轮纹	生于阔叶林中地下枯树桩上
lynk003	子实体无柄,呈红褐色;菌盖近圆形,边缘不规则,呈淡黄色,有轮纹	生于阔叶树腐木桩上
lynk004	子实体有柄,呈红褐色,有漆样光泽;菌盖不规则,边缘薄,呈淡黄色	生于阔叶树倒木上
lynk005	子实体有柄,呈红褐色;菌盖近似椭圆形,边缘不规则	生于阔叶林中地下腐木上
lynk006	子实体为幼嫩阶段,近球形,黄色	生于阔叶林中的立木干基部枯树根上
lynk007	子实体为幼嫩阶段,有 2 个分支,有漆样光泽,近球形,顶端呈淡黄色	生于阔叶树腐木桩上
lynk008	子实体近扇形,白色,有轮纹	生于阔叶林中地下腐木上
lynk009	子实体有柄,近扇形,红褐色,有轮纹	生于阔叶树朽板根上
lynk010	子实体有柄,半圆形,暗红褐色,有轮纹	生于阔叶林中地下腐木上
lynk011	子实体有柄,子实体为幼嫩阶段,扇形,呈黄色,边缘肥厚规则	生于阔叶林中地下腐木桩周围地上
lynk012	子实体有短柄,子实体为幼嫩阶段,近半圆形,呈黄色,边缘肥厚	生于阔叶林中地下腐木木桩上

试验试剂:马铃薯葡萄糖水培养基,购自青岛海博生物公司;马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,购自北京陆桥技术股份有限公司;蛋白胨,购自生工生

物工程(上海)股份有限公司;酵母浸粉、琼脂粉,购自北京奥博星生物技术有限责任公司。

试验仪器: CX43 显微镜,购自日本 Olympus 公

司;超净工作台,购自德国 Airtech 公司;PCR 仪、MD-550 离心机,购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 灵芝菌株基因组的提取及分子鉴定 采用真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA,采用真菌通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 PCR 扩增。扩增条件如下:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。对 PCR 产物进行测序,用 MEGA 7.0 对所测内转录间隔区(ITS)序列进行比对,用邻接(Neighbor joining)法构建系统发育树^[18]。

1.2.2 灵芝菌株生物学特性比较分析

1.2.2.1 菌丝体干质量的测定 量取 50 ml 灵芝发酵液倒入离心管中,10 000 r/min 离心 5 min,将离心后获得的菌丝体转移到已干燥且确保恒质量的称量瓶中,80 ℃烘干,称量,计算菌丝体干质量。每个试验设 2 个重复。

1.2.2.2 pH 值的测定 在超净台中,无菌操作取 15 ml 发酵液于 50 ml 烧杯中,用 pH 计进行测定,测定前 pH 计需要校准,每个试验设 2 个重复。

1.2.2.3 菌落直径及菌落生长速率的测定 用打孔器定量,将各菌株接种于直径 90 mm 的培养皿中,用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基在 25 ℃避光培养 5 d,测量菌落直径。菌落生长速率=菌落直径/培养天数。每个试验设 2 个重复。

1.2.2.4 菌丝吃料长度及吃料速率的测定 将各菌株接种于直径为 12 cm 的菌棒中,于 25 ℃避光培养 13 d,测量吃料长度。吃料速率=吃料长度/培养天数。每个试验设 3 个重复。

1.2.3 灵芝全基因组重测序分析 全基因组重测序试验流程包括 DNA 样品检测、文库构建、文库质控和上机测序等。

1.2.3.1 样品检测 为保证文库构建质量,对基因组 DNA 进行检测,待样品合格后进行文库构建。检测标准如下:琼脂糖凝胶电泳检测结果显示基因组 DNA 主带完整清晰,且无降解或 RNA 污染;Nano-drop 检测所得 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.8~2.2,无蛋白质或肉眼可见的杂质污染;Qubit 3.0 检测 DNA 样品质量浓度大于 40 ng/μl, DNA 总量大于 2 μg。

1.2.3.2 文库的构建 样品基因组 DNA 检测合格后,严格按照 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep

Kit for Illumina® 中提供的标准流程进行文库构建,主要试验步骤如下:将基因组 DNA 用 bioruptorUCD-200 处理成 200~500 bp 的片段;对片段化的 DNA 进行末端修复并加 A 尾巴,然后连接测序接头;根据预期的文库选择特定比例的 AMPure XP Beads 进行目标片段选择,纯化去除接头污染;通过 PCR 富集目标 DNA 片段并用 AMPure XP Beads 进行纯化,即完成测序文库的构建。

1.2.3.3 文库质控 文库构建完成后,对其进行质量检测,检测结果达到要求后方可进行上机测序,检测方法如下:用 Qubit 3.0 进行初步定量;用 Agilent 2100 对文库的插入片段大小(Insert size)进行检测,Insert size 符合预期且无接头污染才可进行下一步试验;用德国 ANALYTIKJENA(耶拿)QTOWER 实时荧光定量 PCR 仪对文库的有效浓度进行准确定量,即有效浓度>2 nmol/L 为合格文库。

1.2.3.4 上机测序 按照目标下机数据量对文库进行 Pooling(集中),用 Illumina HiSeq 平台对 DNA 分子两端分别测序 150 bp。

1.2.4 统计方法 用 SPSS、Excel 软件对数据进行处理分析,用 Duncan's 新复极差法对组间差异显著性进行分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义,用 Photoshop 软件处理图片,用 Origin 9.1 软件对所得数据作图,用 MEGA 7.0 对内转录间隔区序列构建系统发育树,用 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析。

2 结果与分析

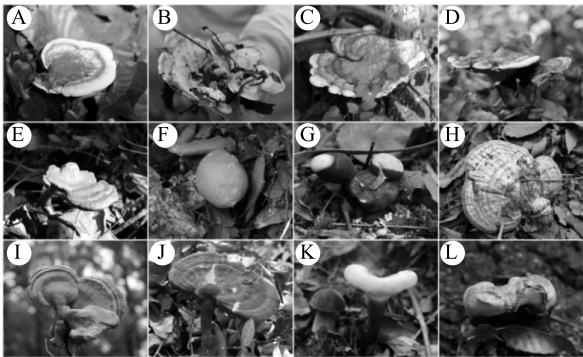
2.1 野生灵芝菌株的分离及保存

本研究采集的野生灵芝详见图 1,生境植被为麻栎、板栗等阔叶树种,幼嫩灵芝子实体呈近球形或近半圆形,已形成菌盖的灵芝厚度不一,菌盖上轮纹明显,大部分幼嫩子实体为淡黄色,菌盖边缘为淡黄色,本研究分离到 1 株白肉灵芝和 1 株树舌灵芝,详见图 1B、图 1H。

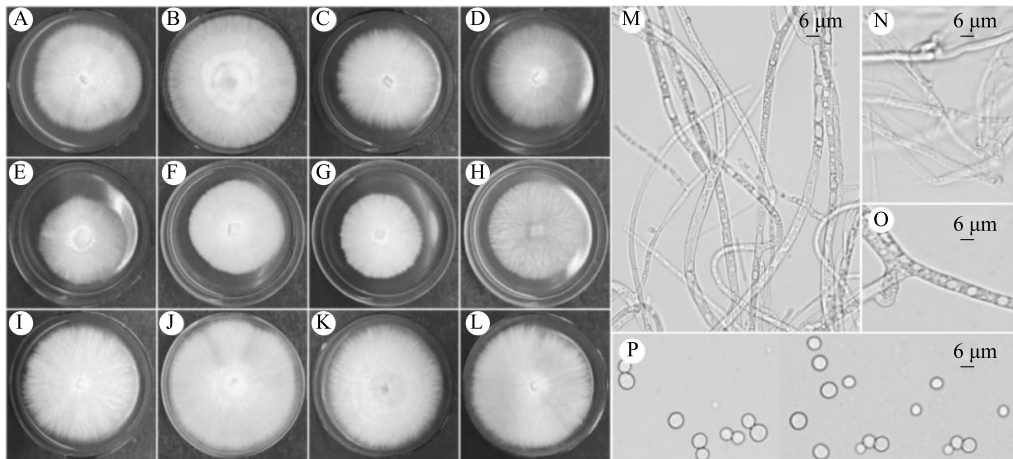
经分离获得灵芝菌株 12 株(图 2A 至图 2L),在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基中,菌落近圆形,菌落周边菌丝表面平整,菌丝色泽为淡黄色或白色,菌丝均匀、浓密,无气生菌丝。通过奥林帕斯显微镜观察发现菌丝分支密度不高(图 2M),且菌丝粗壮(图 2O),有隔膜,可见锁状联合(图 2N),无杂菌。孢子呈球形(图 2P),直径为 4.51~13.52 μm。将分离获得的菌株用试管斜面保存于 4 ℃冰箱。

2.2 灵芝菌株基因组 DNA 的提取及分子鉴定

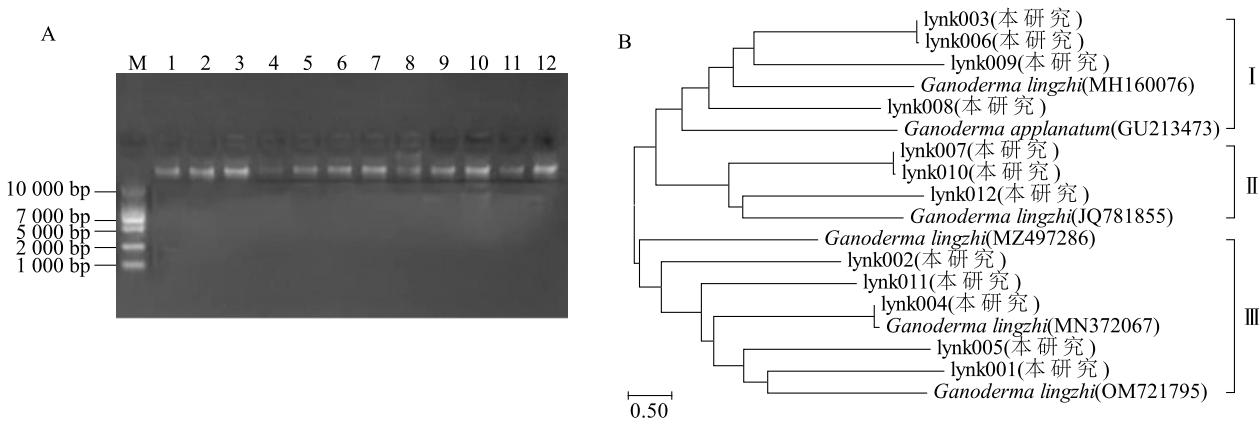
使用真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒分别提取分离获得的 12 株灵芝菌株基因组 DNA,基因组 DNA 的电泳结果见图 3A。将提取的基因组 DNA 低温保存,用于 ITS 分子鉴定和全基因组重测序;通过 ITS 测序,使用邻接法构建系统发育树(图 3B)。从进化树可以看出,12 株野生灵芝被聚成 3 大类,其中第 I 类有 4 株,占总株数的 33.3%,第 II 类有 3 株,占总株数的 25.0%,第 III 类有 5 株,占总株数的 41.7%。由分支情况可知,每个分类的近交程度较低,其中第 III 类表征遗传多样性的参数都高于其他 2 类(I 、 II),表明其遗传性更丰富。



A 至 L 对应编号为 lynk001~lynk012(见表 1)的野生灵芝子实体。
图 1 野生灵芝子实体
Fig.1 Fruiting body of wild *Ganoderma lucidum*



A~L: 编号为 lynk001~lynk012(见表 1)的灵芝菌落形态;M~P:灵芝菌丝和孢子的显微形态。
图 2 灵芝菌落形态和显微结构
Fig.2 Colony morphology and microstructure of *Ganoderma lucidum*

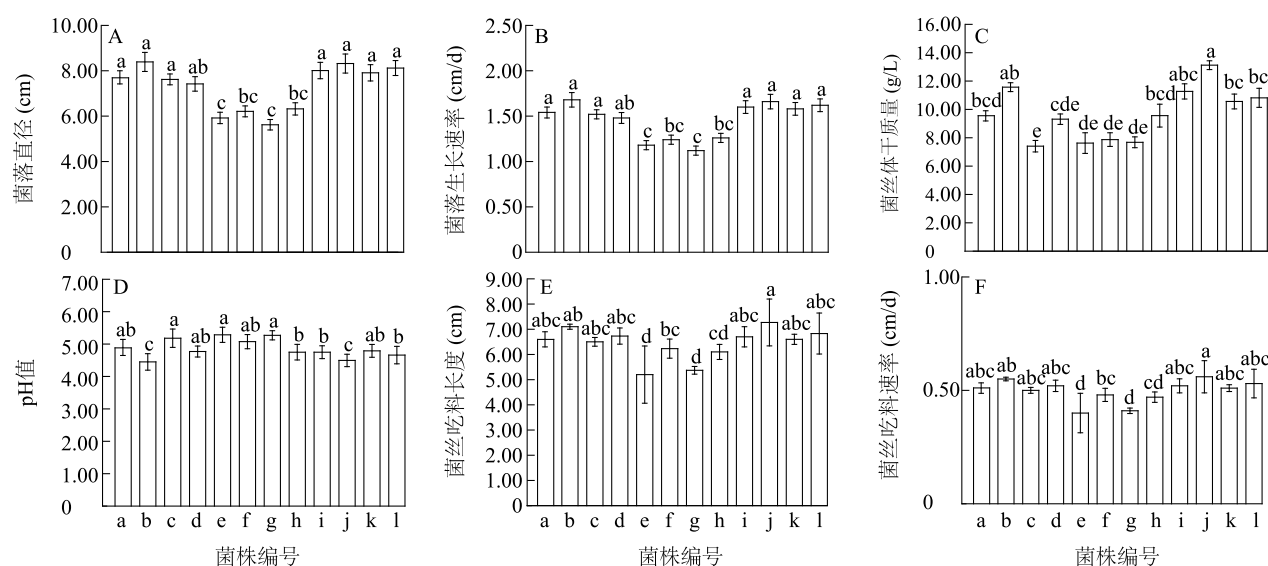


A 图中,M:marker;1~12:编号为 lynk001~lynk012(见表 1)的灵芝基因。
图 3 灵芝基因组电泳结果(A)和内转录间隔区(ITS)序列的系统发育树(B)
Fig.3 Genome electrophoretogram (A) and phylogenetic tree of internal transcribed spacer (ITS) sequence of *Ganoderma lucidum* (B)

2.3 灵芝菌株生物学特性的比较分析

对 12 株灵芝菌株进行生物学特性测试,由图 4 可知,不同菌株之间的菌落直径、菌落生长速率呈现较明显的分化,其中菌株 lynk002 的菌落直径、菌落生长速率最高,分别为 8.39 cm、1.68 cm/d,其次是菌株 lynk010,其菌落直径、菌落生长速率均显著高于菌株 lynk005、lynk006、lynk007 和 lynk008 ($P<0.05$),菌株 lynk007 的菌落直径、菌落生长速率最低。对不同菌株液体发酵生物量进行统计发现,菌株 lynk010 的菌丝体干质量最高,为 13.12 g/L,其次是菌株 lynk002,菌株 lynk003 的菌丝体干质量最低,菌株 lynk010 的菌丝体干质量显著高于菌株 lynk001、lynk003、

lynk004、lynk005、lynk006、lynk007、lynk008、lynk011 和 lynk012 ($P<0.05$)。对不同菌株液体发酵的 pH 值进行统计发现,菌株 lynk005 的 pH 值最高,为 5.29,其次为菌株 lynk007, pH 值为 5.27,菌株 lynk002 的 pH 值最低,为 4.45,菌株 lynk005 的 pH 值显著高于菌株 lynk002、lynk008、lynk009、lynk010 和 lynk012 ($P<0.05$)。对不同菌株菌丝的吃料长度、吃料速率进行统计发现,菌株 lynk010 菌丝的吃料长度、吃料速率分别为 7.27 cm、0.56 cm/d,其次是菌株 lynk002,菌株 lynk010 菌丝的吃料长度、吃料速率显著高于菌株 lynk005、lynk006、lynk007 和 lynk008 菌丝 ($P<0.05$)。



A: 菌落直径; B: 菌落生长速率; C: 菌丝体干质量; D: pH 值; E: 菌丝吃料长度; F: 菌丝吃料速率。a: lynk001; b: lynk002; c: lynk003; d: lynk004; e: lynk005; f: lynk006; g: lynk007; h: lynk008; i: lynk009; j: lynk010; k: lynk011; l: lynk012。lynk001~lynk012 见表 1。不同处理间标有不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

图 4 灵芝菌株的生物学特性比较

Fig.4 Comparison of biological characteristics of *Ganoderma lucidum* strains

2.4 测序数据统计分析

用 Illumina HiSeq 平台对有效数据进行测序,结果显示,高质量的有效读取数总计为 263 448 358 条,总碱基数为 79 034 507 400 bp,平均每条测序有效读取长度为 300 bp,有效读取数、总碱基数最多的是菌株 lynk009,最少的是菌株 lynk008,测序 G+C 含量为 48.04%~58.45%,质量数大于 20 的碱基所占比例 (Q_{20})、质量数大于 30 的碱基所占比例 (Q_{30}) 的平均值分别为 94.55%、88.95%,说明测序出错率低,质量符合要求,建库成功,可用于后续

SNP 标记挖掘,详细数据统计结果见表 2。

2.5 比对率统计分析

以 Liu 等^[19]报道的灵芝单核菌株 DH-8 的全基因组为参考基因组进行比对,由表 3 可以看出,在唯一一位点比对率方面,菌株 lynk002、lynk003 和 lynk008 对应的测序数据唯一一位点比对率较低,其他菌株的唯一一位点比对率为 20.67%~33.40%,平均唯一一位点比对率为 22.63%;多位点比对率为 0.81%~5.68%,平均比对率为 3.68%。本研究采集的灵芝菌株与已报道的灵芝菌株 DH-8 基因组的比对率较

低,说明本研究中的菌株与已报道的菌株之间的遗传距离较远。

2.6 覆盖度、覆盖深度的统计分析

由图 5 可以看出,在覆盖率方面,菌株 lynk002、lynk008 较低,其他菌株的覆盖率较接近,覆盖率为 34.23%~36.78%,平均覆盖率为 30.40%。在覆盖深度方面,菌株 lynk002、lynk003 的覆盖深度相对较低,分别为 18.80、19.04,菌株 lynk009 的覆盖深度最高,为 84.49,平均覆盖深度为 50.68。

2.7 变异类型分析

单核苷酸多态性(SNP)的类型及插入缺失标记(InDel)长度统计结果详见图 6。在本研究中,共获得了 705 742 个变异位点,其中 598 864 个为 SNP,106 878 个为 InDel。SNP 数量统计结果显示,401 001 个 SNP 是转换类型(A/G 和 C/T,为嘌呤之间或嘧啶之间的交换),197 863 个 SNP 是颠换类型(A/C、A/T、C/G 和 G/T,为嘌呤和嘧啶之间的交换),转换颠换比(T_s/T_v)为 2.03。InDel 数量统计结果显示,长度小于或等于 10 bp 的 InDel 占比达到

97.97%,长度大于 10 bp 的 InDel 占比为 2.03%,长度为 2 bp 的 InDel 数量最多,为 35 104 个。

表 2 测序数据统计结果

Table 2 Statistics of sequencing data

菌株编号	有效读取数 (条)	总碱基数 (bp)	G+C 含量 (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
lynk001	27 168 335	8 150 500 500	52.76	95.50	90.07
lynk002	15 832 397	4 749 719 100	48.04	95.89	90.58
lynk003	27 534 890	8 260 467 000	50.47	95.21	89.81
lynk004	23 180 188	6 954 056 400	54.65	95.38	90.35
lynk005	27 384 531	8 215 359 300	54.68	93.68	88.08
lynk006	27 999 122	8 399 736 600	54.78	95.44	90.18
lynk007	14 231 180	4 269 354 000	52.62	93.98	87.67
lynk008	13 008 698	3 902 609 400	58.45	90.40	83.91
lynk009	29 253 782	8 776 134 600	53.81	95.72	90.50
lynk010	13 881 890	4 164 567 000	55.07	94.17	88.53
lynk011	23 459 606	7 037 881 800	54.54	95.95	90.84
lynk012	20 513 739	6 154 121 700	49.17	93.25	86.90
平均			53.25	94.55	88.95

Q30:质量数大于 30 的碱基所占比例;Q20:质量数大于 20 的碱基所占比例。lynk001~lynk012 见表 1。

表 3 测序数据比对率统计结果

Table 3 Comparison rate statistics of sequencing data

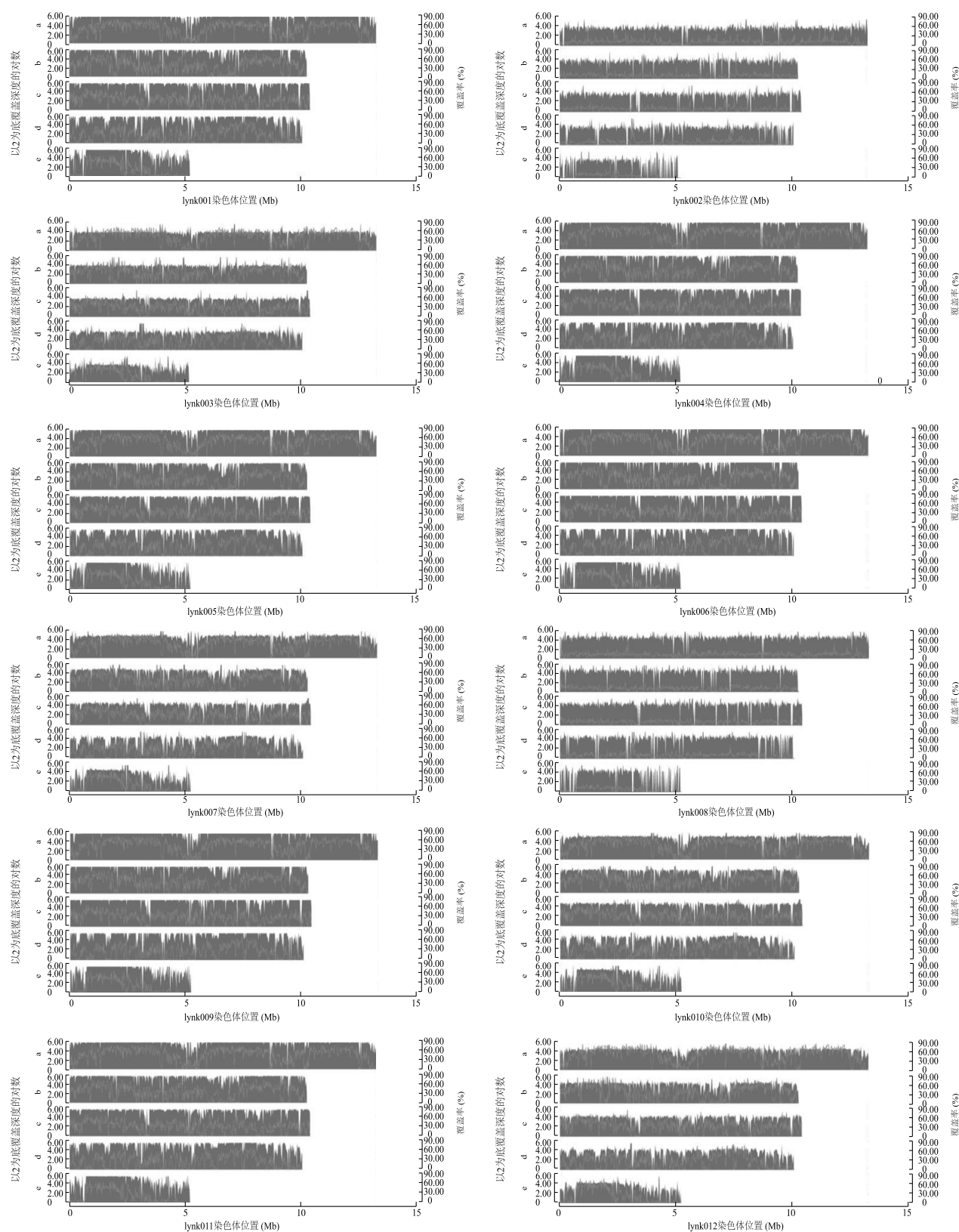
菌株编号	唯一位点 比对数(个)	唯一位点 比对率(%)	多位点 比对数(个)	多位点 比对率(%)	未比对数 (个)	未比对率 (%)
lynk001	7 995 591	29.43	1 371 399	5.05	17 801 346	65.52
lynk002	398 733	2.52	178 977	1.13	15 254 688	96.35
lynk003	2 412 448	8.76	683 603	2.48	24 438 839	88.76
lynk004	7 741 704	33.40	1 317 287	5.68	14 121 197	60.92
lynk005	7 515 859	27.45	1 109 648	4.05	18 759 024	68.50
lynk006	9 094 346	32.48	1 243 168	4.44	17 661 608	63.08
lynk007	3 301 966	23.20	486 493	3.42	10 442 722	73.38
lynk008	467 318	2.28	165 249	0.81	19 881 172	96.92
lynk009	9 408 997	32.16	1 556 688	5.32	18 288 098	62.52
lynk010	3 787 283	27.28	634 965	4.57	9 459 642	68.14
lynk011	7 484 028	31.90	1 157 495	4.93	14 818 083	63.16
lynk012	2 689 262	20.67	298 686	2.30	10 020 750	77.03
平均	5 191 461	22.63	850 305	3.68	15 912 264	73.69

lynk001~lynk012 见表 1。

2.8 变异在基因组上的分布

如表 4 所示,5 条染色体中 SNP 总数量为 598 864 个,在染色体 Chr01 中,SNP 最多,数量为 275 900 个,占比为 46.07%,同时染色体 Chr01 对应

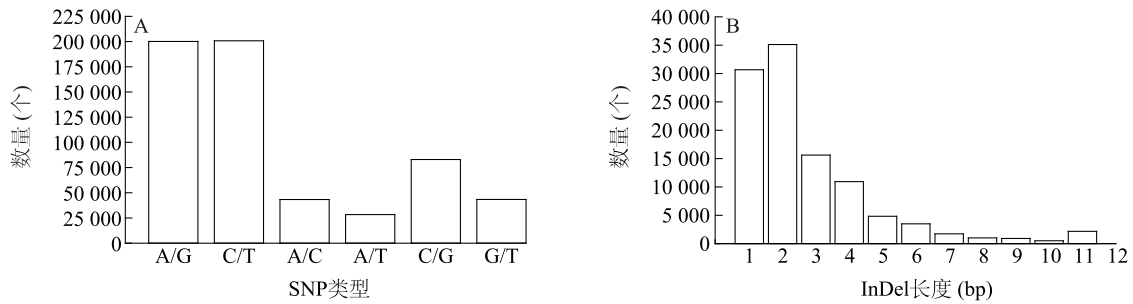
的 SNP 密度也最高;插入或缺失导致的基因差异在染色体 Chr01 上表现得较明显,InDel 数量为 47 355 个,占总 InDel 数量的 44.31%,同时对应的 InDel 密度也最高。



以 20 kb 窗口为单位进行统计。lynk001~lynk012 见表 1。a:染色体 1;b:染色体 2;c:染色体 3;d:染色体 4;e:染色体 5。

图 5 测序数据对基因组的覆盖度、覆盖深度分布

Fig.5 Distribution of coverage and depth of genome by sequencing data



A: SNP 类型; B: InDel 长度。

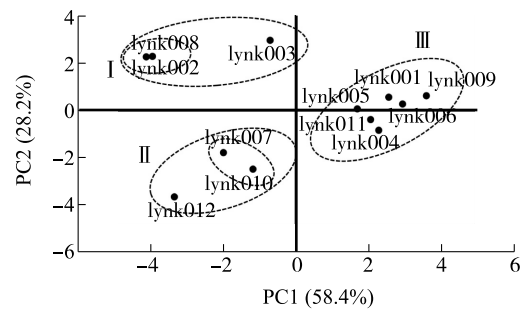
图 6 插入缺失标记 (InDel) 长度和单核苷酸多态性 (SNP) 类型统计结果

Fig.6 Statistical results of insertion or deletion (InDel) length and single nucleotide polymorphism (SNP) type

表 4 变异数量及密度统计结果

Table 4 Number of mutations and density

染色体	长度 (Mb)	SNP 数量 (个)	SNP 密度 (个, 1 Mb)	InDel 数量 (个)	InDel 密度 (个, 1 Mb)
1	13 352 148	275 900	20 663.34	47 355	3 546.62
2	10 330 694	123 968	11 999.97	22 308	2 159.39
3	10 468 304	88 845	8 487.05	16 798	1 604.65
4	10 132 887	70 641	6 971.46	12 899	1 272.98
5	5 245 009	39 510	7 532.88	7 518	1 433.36
合计	49 529 042	598 864	12 091.17	106 878	2 157.89



PC1: 主成分 1; PC2: 主成分 2。lynk001~lynk012 见表 1。

图 7 灵芝菌株的主成分分析

Fig. 7 Principal component analysis of *Ganoderma lucidum* strain

2.9 主成分分析

为总体分析灵芝菌株之间的遗传关系,对测序数据进行主成分分析。如图 7 所示,贡献度排前 2 位的主成分 1、主成分 2 的特征值分别为 58.4%、28.2%,合计贡献率为 86.6%。根据菌株分布情况,大致可以分为 3 簇(或 3 类),第 I 簇位于第 1 象限,共 3 个菌株,为 lynk002、lynk003 和 lynk008,其中 lynk002 和 lynk008 分布得更集中;第 II 簇位于第 3 象限,共 3 个菌株,为 lynk007、lynk010 和 lynk012,其中 lynk007 和 lynk010 分布得相对较近;第 III 簇位于第 2 象限和第 4 象限交汇处,共 6 个菌株,为 lynk001、lynk004、lynk005、lynk006、lynk009 和 lynk011。

3 讨论

有研究发现,除金针菇、黑木耳等少数单核菌丝可以形成子实体外,多数食用菌只有双核菌丝才能形成子实体,双核菌丝体与单核菌丝体相比,具有分支快、菌丝健壮和稳定性好等优势,因此在食用菌生产中,菌株大多选择双核菌丝^[20]。本研究分离的灵

芝菌株具有锁状联合,而锁状联合是双核菌丝的鉴定标准,因此本研究采集的菌株具备形成子实体的条件。菌落生长速率、液体发酵菌丝体干质量和菌丝吃料速率等参数反映了菌丝的活力,而且呈正相关,菌株活力也关系着菌株优劣、后续出菇好坏、栽培时间和子实体产量等^[21]。韩鹏等^[22]以羊肚菌菌丝生长速度、长势作为菌株优劣的评价标准,董玉兰等^[23-24]分别结合菌丝萌发活力、生物量对白灵菇、桑黄菌株的活力进行评价。本研究结果显示,在连云港不同区域采集的野生灵芝种质资源,菌株之间的生物学特性存在较大差异,菌落生长速率、液体发酵菌丝体干质量和菌丝吃料速率最高值分别是最低值的 1.49 倍、1.77 倍和 1.40 倍,差异程度达到显著水平 ($P < 0.05$),三者之间呈正相关趋势,而与发酵液的 pH 值呈负相关趋势。

Brown 等^[25]对 32 个花生品种进行了全基因组重测序,对品种间基于系谱和基于 SNP 的遗传相似性进行对比,发现基于全基因组重测序数据获得的结果更加准确,具有高度相关性的品种紧密地聚在

一起,可见重测序在探索品种的遗传多样性、鉴定未知来源材料方面具有不可比拟的优越性。郭敏杰等^[26]发现,基因型数据更能准确地反映品种内在遗传基础。本研究通过 ITS 聚类分析,将 12 株野生灵芝种质资源聚成 3 大类,通过主成分分析,根据菌株在坐标上的分布情况,同样将这 12 个菌株分为 3 类,其中聚类分析的第 2 类与主成分分析的第 II 簇完全吻合,而聚类分析的第 I、III 类与主成分分析的第 I、III 簇存在一定出入,聚类分析中第 I 类中的 lynk006、lynk009 在主成分分析中聚为第 III 簇,聚类分析中第 III 类中的 lynk002 在主成分分析中聚为第 I 簇,由于主成分分析数据基于全基因组重测序数据,该方法更可靠,上述 2 种分析方法的第 III 类表征遗传多样性的参数都高于其他 2 类(I、II),说明第 III 类具有更丰富的遗传多样性。

目前基于二代测序的全基因组重测序技术已作为主流方法应用于很多物种 SNP 标记的开发^[27]。Shen 等^[28]揭示了四倍体棉花的 SNP 和 InDel 多样性,Zhang 等^[29]确定了辣椒第 1 花节的候选基因,但灵芝这方面的研究还未见相关报道。本研究所测序的 Q20、Q30 占比较高,说明测序出错率很低,GC 分布正常,数据量达到预期目标,本研究采集的灵芝菌株与已报道的灵芝菌株 DH-8 的基因组比对率较低,说明本研究中的菌株与已报道的菌株之间遗传距离较远。12 株灵芝中的 SNP 数量为 598 864 个,InDel 数量为 106 878 个,在第 1 条染色体中 SNP 最多,占比 46.07%,SNP 中转换颠换比 (T_s/T_v) 为 2.03,说明变异以转换为主,插入或缺失导致的基因差异在第 1 条染色体上表现得较为明显,占总 InDel 数的 44.31%,表明可能有更多的功能基因在第 1 条染色体上,第 1 条染色体可以用于进一步挖掘更多功能基因。

4 结 论

本研究对连云港范围内野生灵芝生物学特性进行分析,使用全基因组重测序技术对灵芝基因组进行测序,并进行序列特征分析和主成分分析。结果表明,从不同区域采集的野生灵芝种质资源在菌落生长速率、液体发酵液生物量和菌丝吃料速率等生物特性方面展现出较大差异;通过主成分分析将 12 株野生灵芝种质资源聚为 3 类,其中第 III 类具有更丰富的遗传多样性。在 12 株灵芝基因组中,第 1 条

染色体的 SNP 最多,变异以转换为主,插入或缺失导致的基因差异在第 1 条染色体上表现得明显,说明可能有更多功能基因在第 1 条染色体上,第 1 条染色体可以用于进一步挖掘更多的功能基因。本研究结果可为后期分子标注技术与灵芝生物学特性、表型性状评价相结合,创造优质种质资源和挖掘优质基因提供科学的理论基础。

参考文献:

- [1] 胡惠萍,刘远超,莫伟鹏,等. 两株西藏白肉灵芝菌株特性初探[J]. 食用菌学报,2017,24(1):50-54.
- [2] 戴玉成,曹云,周丽伟,等. 中国灵芝学名之管见[J]. 菌物学报,2013,32(6):947-952.
- [3] SOHRETOGLU D, HUANG S. *Ganoderma lingzhi* polysaccharides as an anti-cancer agent[J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2018, 18(5):667-674.
- [4] 王朝川. 灵芝成分及功能的研究现状[J]. 中国果菜,2018,38(8):45-47,53.
- [5] MENG J, WANG S Z, HE J Z, et al. Ganoderic acid A is the effective ingredient of *Ganoderma triterpenes* in retarding renal cyst development in polycystic kidney disease[J]. *International Journal of Sports Medicine*, 2020, 41(6):782-790.
- [6] 李丹妮,朱长俊,郑雨晴,等. 灵芝种植及初加工研究进展[J]. 南方农业,2021,15(8):233-235.
- [7] 崔黎明,刘利,潘丽艳,等. 灵芝孢子误诊为寄生虫虫卵 3 例分析[J]. 中国实验诊断学,2016,20(7):1191-1192.
- [8] 蒙田秀,杨力龙,龚志强,等. 壮族药白鹤灵芝萜类化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(10):213-219.
- [9] 王梦晨,张雪涟,陈向东,等. 灵芝三萜与灵芝多糖抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(5):234-241.
- [10] CHEN L H, ABUDUMIJITI A, LI M. Protective effect of *Ganoderma* (Lingzhi) on radiation and chemotherapy[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1182:119-142.
- [11] REN L, ZHANG J, ZHANG T H. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Ganoderma* on immune effector cells[J]. *Food Chemistry*, 2021, 340:127933.
- [12] 庄静. 试论中药灵芝补肺汤在支气管哮喘病例治疗中的临床应用效果观察[J]. 中国医药指南,2017,15(21):183-184.
- [13] 沈滢惠,温亚格,唐庆九,等. 灵芝抗肿瘤活性及其机制研究进展[J]. 海峡药学,2020,32(4):8-12.
- [14] 兰慧莹,毛可红,陈俏彪,等. 工艺灵芝的制作技术刍议[J]. 食用菌,2019,27(6):427-429.
- [15] 唐才明,张燕,陈娇娇,等. CO₂缓释剂在盆栽灵芝中应用初探[J]. 食用菌,2019,41(2):55-56, 65.
- [16] 豆芬芬. 连云港港口与城市耦合协调发展研究[D]. 徐州:中国矿业大学,2014.

- [17] 林祥天, 邵世光, 吕继江, 等. 连云港地区食用菌和毒菌的研究[J]. 江苏预防医学, 1997(4): 13-14.
- [18] 邢 炜, 洪 豆, 徐碧林, 等. 黄冈大别山一株野生灵芝的鉴定与驯化栽培[J]. 中国食用菌, 2021, 40(10): 28-33.
- [19] LIU Y C, HUANG L H, HU H P, et al. Whole-genome assembly of *Ganoderma leucocontextum* (Ganodermataceae, Fungi) discovered from the Tibetan Plateau of China[J]. G3 Genes & Genomes | Genetics, 2021, 11(12): jkab337.
- [20] 鲍大鹏. 食用菌杂交育种中的科学问题[J]. 食用菌学报, 2020, 27(4): 1-24.
- [21] 张先吉, 花 纪, 颜俊清, 等. 几株主栽灵芝菌株液体菌种培养基优化及其活力评价[J]. 食品科技, 2020, 45(4): 19-25.
- [22] 韩 鹏, 陈青君, 贺国强, 等. 2种野生羊肚菌分离、鉴定与菌丝培养条件[J]. 北京农学院学报, 2018, 33(1): 37-42.
- [23] 董玉兰, 李书生, 张丽萍, 等. 白灵菇高活力液体菌种摇瓶发酵培养条件的优化[J]. 北方园艺, 2014(6): 143-146.
- [24] 曲德辉, 杨 焱, 张赫男, 等. 桑黄菌株活力评价及优良菌株筛选[J]. 菌物学报, 2016, 35(10): 1187-1198.
- [25] BROWN N, BRANCH W D, JOHNSON M, et al. Genetic diversity assessment of Georgia peanut cultivars developed during ninety years of breeding[J]. The Plant Genome, 2021, 14(3): e20141.
- [26] 郭敏杰, 邓 丽, 李玉荣, 等. 基于主成分和聚类分析的冀花高油酸花生品种综合评价[J]. 中国油料作物学报, 2022, 44(6): 1210-1217.
- [27] OGDEN R, GHARBI K, MUGUE N, et al. Sturgeon conservation genomics: SNP discovery and validation using RAD sequencing[J]. Molecular Ecology, 2013, 22(11): 3112-3123.
- [28] SHEN C, JIN X, ZHU D, et al. Uncovering SNP and indel variations of tetraploid cottons by SLAF-seq[J]. BMC Genomics, 2017, 18: 247.
- [29] ZHANG X F, WANG G Y, CHEN B, et al. Candidate genes for first flower node identified in pepper using combined SLAF-seq and BSA[J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0194071.

(责任编辑: 徐 艳)