



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 121023078 A

(43) 申请公布日 2025. 11. 28

(21) 申请号 202511287008.5

(22) 申请日 2025.09.10

(71) 申请人 天津市农业科学院

地址 300192 天津市南开区白堤路268号

(72) 发明人 李凤美 刘连强 罗莹 贺丽霞

张扬 李淑芳 张志军 王文治

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

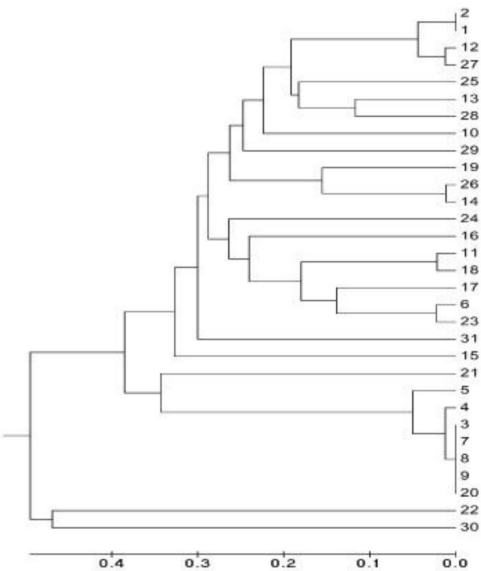
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

一种基于猴头菇转录组序列开发的SSR标记引物组及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种基于猴头菇转录组序列开发的SSR标记引物组及其应用,属于分子标记技术领域。本发明所述引物组包括SSR-14引物对、SSR-17引物对、SSR-33引物对、SSR-56引物对、SSR-63引物对、SSR-67引物对、SSR-69引物对、SSR-72引物对、SSR-78引物对、SSR-81引物对、SSR-94引物对、SSR-95引物对、SSR-97引物对和SSR-99引物对。利用本发明引物组进行群体遗传多样性分析,填补了猴头菇属基于转录组开发SSR引物的空白,有助于了解猴头菇属不同种群之间的遗传联系,为保护遗传资源和制定种质保存策略提供科学依据。



1. 一种基于猴头菇转录组序列的SSR分子标记的引物组,其特征在于,所述引物组包括SSR-14引物对、SSR-17引物对、SSR-33引物对、SSR-56引物对、SSR-63引物对、SSR-67引物对、SSR-69引物对、SSR-72引物对、SSR-78引物对、SSR-81引物对、SSR-94引物对、SSR-95引物对、SSR-97引物对和SSR-99引物对;

所述SSR-14引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.1所示,反向引物序列如SEQ ID NO.2所示;

所述SSR-17引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.3所示,反向引物序列如SEQ ID NO.4所示;

所述SSR-33引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.5所示,反向引物序列如SEQ ID NO.6所示;

所述SSR-56引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.7所示,反向引物序列如SEQ ID NO.8所示;

所述SSR-63引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.9所示,反向引物序列如SEQ ID NO.10所示;

所述SSR-67引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.11所示,反向引物序列如SEQ ID NO.12所示;

所述SSR-69引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.13所示,反向引物序列如SEQ ID NO.14所示;

所述SSR-72引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.15所示,反向引物序列如SEQ ID NO.16所示;

所述SSR-78引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.17所示,反向引物序列如SEQ ID NO.18所示;

所述SSR-81引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.19所示,反向引物序列如SEQ ID NO.20所示;

所述SSR-94引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.21所示,反向引物序列如SEQ ID NO.22所示;

所述SSR-95引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.23所示,反向引物序列如SEQ ID NO.24所示;

所述SSR-97引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.25所示,反向引物序列如SEQ ID NO.26所示;

所述SSR-99引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.27所示,反向引物序列如SEQ ID NO.28所示。

2. 根据权利要求1所述的引物组,其特征在于,所有的正向引物连接荧光标记;所述荧光标记为FAM或HEX。

3. 权利要求1或2所述的引物组在猴头菇种质资源鉴定中的应用。

4. 权利要求1或2所述的引物组在猴头菇遗传育种中的应用。

5. 权利要求1或2所述的引物组在猴头菇群体遗传学分析中的应用,其特征在于,所述群体遗传学分析包括遗传多样性分析和亲缘关系分析。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述亲缘关系通过UPMGA进化树进行分析。

7. 一种分析猴头菇群体遗传学的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(7.1) 提取猴头菇DNA;

(7.2) 利用权利要求2所述的引物组中的引物对分别对步骤(7.1)获得的DNA进行PCR扩增,获得荧光PCR扩增产物;

(7.3) 将步骤(7.2)得到的荧光PCR扩增产物进行毛细管电泳检测与数据处理;

(7.4) 利用步骤(7.3)中数据处理结果进行猴头菇群体遗传学分析。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤(7.2)所述PCR扩增体系以15 $\mu$ L计,包括以下组分:50ng/ $\mu$ L DNA模板1 $\mu$ L、2 $\times$  PCRMix 7.5 $\mu$ L、10mmol/L的正向荧光引物0.3 $\mu$ L、10mmol/L的反向引物0.3 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 5.9 $\mu$ L。

9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤(7.2)所述PCR扩增的程序如下:98 $^{\circ}$ C预变性3min;94 $^{\circ}$ C变性20s,55~60 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸40s,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5min。

10. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤(7.4)所述猴头菇群体遗传学分析的具体步骤为:

(10.1) 根据所述步骤(7.3)中数据处理结果,计算SSR位点的各项遗传多样性指标;

(10.2) 统计每个位点的等位基因数、Nei's基因多样性、Shannon's多样性指数,计算多态性信息含量。

## 一种基于猴头菇转录组序列开发的SSR标记引物组及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子标记技术领域,尤其涉及一种基于猴头菇转录组序列开发的SSR标记引物组及其应用。

### 背景技术

[0002] 猴头菇(*Hericium erinaceus*),又称猴头菌、猴头蘑,属于多孔菌目、猴头菌科、猴头属,因子实体形状酷似小猴子的头而得名,子实体味道鲜美,富含蛋白质和多糖,是一种兼具食、药用价值的名贵食用菌。随着生活水平提高,人们对食物的营养有更高的要求,珍稀食用菌品种被大面积种植,猴头菇作为一种食药同源的食用菌,被广泛栽培。猴头菇菌株可以通过无性繁殖产生子实体,如何快速、准确地确定菌株来源,对于菌种溯源和保护极为重要。

[0003] 随着分子生物学的发展,基因组测序技术的普及,以基因组为基础的分子标记技术得到快速发展。简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记是一种基于PCR反应的分子标记技术,一般为1~6个核苷酸重复类型,将几十个核苷酸构成一起的串联重复序列。每个SSR两侧的序列通常是相对保守的单拷贝序列,在基因组的不同位置广泛分布。SSR标记相较于其他分子标记具有分布广泛、位点特异性强、重复性高等优点,被广泛应用于遗传图谱构建、分子标记辅助育种、品种鉴定和遗传多样性研究。

[0004] 因此,利用SSR标记对不同来源猴头菇菌株进行分子标记分析,可为研究猴头菇属遗传多样性及种质资源鉴别、保护和育种奠定基础。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种基于猴头菇转录组序列开发的SSR标记引物组及其应用。本发明在猴头菇转录组序列的基础上,基于获得的大量SSR信息,通过PCR检测对选取的部分SSR进行验证和多态性分析,从而获得具有通用型的多态性引物,为猴头菇属遗传多样性及种质资源鉴别、保护和育种奠定基础。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供一种基于猴头菇转录组序列的SSR分子标记的引物组,所述引物组包括SSR-14引物对、SSR-17引物对、SSR-33引物对、SSR-56引物对、SSR-63引物对、SSR-67引物对、SSR-69引物对、SSR-72引物对、SSR-78引物对、SSR-81引物对、SSR-94引物对、SSR-95引物对、SSR-97引物对和SSR-99引物对;

[0008] 所述SSR-14引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.1所示,反向引物序列如SEQ ID NO.2所示;

[0009] 所述SSR-17引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.3所示,反向引物序列如SEQ ID NO.4所示;

[0010] 所述SSR-33引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.5所示,反向引物序列如SEQ ID NO.6所示;

[0011] 所述SSR-56引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.7所示,反向引物序列如SEQ ID NO.8所示;

[0012] 所述SSR-63引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.9所示,反向引物序列如SEQ ID NO.10所示;

[0013] 所述SSR-67引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.11所示,反向引物序列如SEQ ID NO.12所示;

[0014] 所述SSR-69引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.13所示,反向引物序列如SEQ ID NO.14所示;

[0015] 所述SSR-72引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.15所示,反向引物序列如SEQ ID NO.16所示;

[0016] 所述SSR-78引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.17所示,反向引物序列如SEQ ID NO.18所示;

[0017] 所述SSR-81引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.19所示,反向引物序列如SEQ ID NO.20所示;

[0018] 所述SSR-94引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.21所示,反向引物序列如SEQ ID NO.22所示;

[0019] 所述SSR-95引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.23所示,反向引物序列如SEQ ID NO.24所示;

[0020] 所述SSR-97引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.25所示,反向引物序列如SEQ ID NO.26所示;

[0021] 所述SSR-99引物对的正向引物序列如SEQ ID NO.27所示,反向引物序列如SEQ ID NO.28所示。

[0022] 作为优选,所有的正向引物连接荧光标记;所述荧光标记为FAM或HEX。

[0023] 本发明提供了所述的引物组在猴头菇种质资源鉴定中的应用。

[0024] 本发明提供了所述的引物组在猴头菇遗传育种中的应用。

[0025] 本发明还提供了所述的引物组在猴头菇群体遗传学分析中的应用,所述群体遗传学分析包括遗传多样性分析和亲缘关系分析。

[0026] 作为优选,所述亲缘关系通过UPMGA进化树进行分析。

[0027] 本发明还提供了一种分析猴头菇群体遗传学的方法,包括以下步骤:

[0028] (7.1) 提取猴头菇DNA;

[0029] (7.2) 利用所述的引物组中的引物对分别对步骤(7.1)获得的DNA进行PCR扩增,获得荧光PCR扩增产物;

[0030] (7.3) 将步骤(7.2)得到的荧光PCR扩增产物进行毛细管电泳检测与数据处理;

[0031] (7.4) 利用步骤(7.3)中数据处理结果进行猴头菇群体遗传学分析。

[0032] 作为优选,步骤(7.2)所述PCR扩增体系以15 $\mu$ L计,包括以下组分:50ng/ $\mu$ L DNA模板1 $\mu$ L、2 $\times$  PCR Mix 7.5 $\mu$ L、10mmol/L的正向荧光引物0.3 $\mu$ L、10mmol/L的反向引物0.3 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 5.9 $\mu$ L。

[0033] 作为优选,步骤(7.2)所述PCR扩增的程序如下:98 $^{\circ}$ C预变性3min;94 $^{\circ}$ C变性20s,55 $^{\circ}$ ~60 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸40s,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5min。

- [0034] 作为优选,步骤(7.4)所述猴头菇群体遗传学分析的具体步骤为:
- [0035] (10.1)根据所述步骤(7.3)中数据处理结果,计算SSR位点的各项遗传多样性指标;
- [0036] (10.2)统计每个位点的等位基因数、Nei's基因多样性、Shannon's多样性指数,计算多态性信息含量。
- [0037] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:本发明提供的SSR标记引物对,引物的多态性丰富、扩增稳定、扩增条带易于鉴定,是稳定存在的新标记,填补了猴头菇属基于转录组开发SSR引物的空白,有助于了解猴头菇属不同种群之间的遗传联系。为猴头菇属遗传多样性及种质资源鉴别、保护和育种奠定基础。

### 附图说明

- [0038] 图1为实施例1中猴头菇2号品种引物SSR-69基因型的毛细管电泳图;
- [0039] 图2为实施例1中猴头菇5号品种引物SSR-69基因型的毛细管电泳图;
- [0040] 图3为实施例1中猴头菇22号品种引物SSR-69基因型的毛细管电泳图;
- [0041] 图4为实施例1中猴头菇2号品种引物SSR-72基因型的毛细管电泳图;
- [0042] 图5为实施例1中猴头菇5号品种引物SSR-72基因型的毛细管电泳图;
- [0043] 图6为实施例1中猴头菇22号品种引物SSR-72基因型的毛细管电泳图;
- [0044] 图7为实施例1中猴头菇2号品种引物SSR-78基因型的毛细管电泳图;
- [0045] 图8为实施例1中猴头菇5号品种引物SSR-78基因型的毛细管电泳图;
- [0046] 图9为实施例1中猴头菇22号品种引物SSR-78基因型的毛细管电泳图;
- [0047] 图10为实施例1中猴头菇2号品种引物SSR-95基因型的毛细管电泳图;
- [0048] 图11为实施例1中猴头菇5号品种引物SSR-95基因型的毛细管电泳图;
- [0049] 图12为实施例1中猴头菇22号品种引物SSR-95基因型的毛细管电泳图;
- [0050] 图13为实施例1中猴头菇2号品种引物SSR-97基因型的毛细管电泳图;
- [0051] 图14为实施例1中猴头菇5号品种引物SSR-97基因型的毛细管电泳图;
- [0052] 图15为实施例1中猴头菇22号品种引物SSR-97基因型的毛细管电泳图;
- [0053] 图16为实施例2中利用14对引物在31份猴头菇属遗传多样性聚类分析图。

### 具体实施方式

- [0054] 本发明提供一种基于猴头菇转录组序列的SSR分子标记的引物组,所述引物组包括SSR-14引物对、SSR-17引物对、SSR-33引物对、SSR-56引物对、SSR-63引物对、SSR-67引物对、SSR-69引物对、SSR-72引物对、SSR-78引物对、SSR-81引物对、SSR-94引物对、SSR-95引物对、SSR-97引物对和SSR-99引物对,具体见表1。
- [0055] 表1SSR引物序列

| 引物名称   | 引物序列 (正向) | 引物序列 (反向)                               | 产物长度 (bp)                               | 荧光标记       |
|--------|-----------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|------------|
| [0056] | SSR-14    | TTCTCCTCGCTTTTCCGTTA<br>(SEQ ID NO.1)   | AAGAATCCAGACAGCATCCG<br>(SEQ ID NO.2)   | 228<br>HEX |
|        | SSR-17    | CAGACGGAAAAGCTGAAAGG<br>(SEQ ID NO.3)   | TGAGCTGGTCAGACTTGGTG<br>(SEQ ID NO.4)   | 263<br>HEX |
|        | SSR-33    | ATTCCAGTCCAGTGTCCAGC<br>(SEQ ID NO.5)   | CCACAGTAATAGCCGACCGT<br>(SEQ ID NO.6)   | 261<br>HEX |
|        | SSR-56    | GCATTTTCAGCTGGATGGTT<br>(SEQ ID NO.7)   | TCCTACTCACCGCTGTCCTC<br>(SEQ ID NO.8)   | 220<br>FAM |
|        | SSR-63    | ATGGATCAGCCTGAATGACC<br>(SEQ ID NO.9)   | CACGTCTTGGATCCTGGTTT<br>(SEQ ID NO.10)  | 266<br>HEX |
|        | SSR-67    | CCCCAAAACCTTTGTGACGAT<br>(SEQ ID NO.11) | CCTTACGGCTCGGAATATGA<br>(SEQ ID NO.12)  | 133<br>FAM |
|        | SSR-69    | TCCGTTGAGGATGATGATGA<br>(SEQ ID NO.13)  | TGAGTTGGTCCCAGTTGACA<br>(SEQ ID NO.14)  | 174<br>FAM |
|        | SSR-72    | GGTCCTGGGATAGGACATCA<br>(SEQ ID NO.15)  | ATTAATGCGCGGATTGTTTC<br>(SEQ ID NO.16)  | 190<br>FAM |
|        | SSR-78    | GACCAAAAACACATCGCAGA<br>(SEQ ID NO.17)  | AGAGACATTTTCGCGTTCGT<br>(SEQ ID NO.18)  | 268<br>HEX |
|        | SSR-81    | AGCATTGCTCTCAAGTCCGT<br>(SEQ ID NO.19)  | TCATTTC AACACCCTCGTGA<br>(SEQ ID NO.20) | 151<br>FAM |
| [0057] | SSR-94    | CACAAACCAAGAAGCGAACA<br>(SEQ ID NO.21)  | AGAAAACATACCCCCTCGCT<br>(SEQ ID NO.22)  | 234<br>HEX |
|        | SSR-95    | CAGCGTCCAAGTCGGTTT<br>(SEQ ID NO.23)    | ACCTCAGATGCCTCAACCAG<br>(SEQ ID NO.24)  | 214<br>FAM |
|        | SSR-97    | GGACACGGACATGGTGGT<br>(SEQ ID NO.25)    | GCCCAGCGATCGAGTAAATA<br>(SEQ ID NO.26)  | 266<br>HEX |
|        | SSR-99    | GAGGACGACGACTTCTTTGG<br>(SEQ ID NO.27)  | GCTCGTTTCCACCACTGTCT<br>(SEQ ID NO.28)  | 271<br>HEX |

[0058] 在本发明中,所有的正向引物连接荧光标记;所述荧光标记为FAM或HEX,具体见下

表1。

[0059] 本发明提供了所述的引物组在猴头菇种质资源鉴定中的应用。

[0060] 本发明提供了所述的引物组在猴头菇遗传育种中的应用。

[0061] 在本发明中,所述遗传育种包括育种和分子标记辅助育种。

[0062] 本发明还提供了所述的引物组在猴头菇群体遗传学分析中的应用,所述群体遗传学分析包括遗传多样性分析和亲缘关系分析。

[0063] 在本发明中,所述亲缘关系通过UPMGA进化树进行分析,使用的软件为GenAIex。

[0064] 本发明还提供了一种分析猴头菇群体遗传学的方法,包括以下步骤:

[0065] (7.1) 提取猴头菇DNA;

[0066] (7.2) 利用所述的引物组中的引物对分别对步骤(7.1)获得的DNA进行PCR扩增,获得荧光PCR扩增产物;

[0067] (7.3) 将步骤(7.2)得到的荧光PCR扩增产物进行毛细管电泳检测与数据处理;

[0068] (7.4) 利用步骤(7.3)中数据处理结果进行猴头菇群体遗传学分析。

[0069] 在本发明中,提取猴头菇DNA。所述DNA提取采用植物基因组DNA提取试剂盒提取供试猴头菇的基因组。

[0070] 在本发明中,所述的引物组中的引物对分别对步骤(7.1)获得的DNA进行PCR扩增,获得荧光PCR扩增产物。所述PCR扩增体系以15 $\mu$ L计,包括以下组分:50ng/ $\mu$ L DNA模板1 $\mu$ L、2 $\times$  PCRMix 7.5 $\mu$ L、10mmol/L的正向荧光引物0.3 $\mu$ L、10mmol/L的反向引物0.3 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 5.9 $\mu$ L。步骤(7.2)所述PCR扩增的程序如下:98 $^{\circ}$ C预变性3min;94 $^{\circ}$ C变性20s,55~60 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸40s,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5min。

[0071] 在本发明中,将步骤(7.2)得到的荧光PCR扩增产物进行毛细管电泳检测与数据处理。所述数据处理使用DataFormater、GeneMaker软件。

[0072] 在本发明中,步骤(7.4)所述猴头菇群体遗传学分析的具体步骤为:

[0073] (10.1) 根据所述步骤(7.3)中数据处理结果,计算SSR位点的各项遗传多样性指标;

[0074] (10.2) 统计每个位点的等位基因数、Nei's基因多样性、Shannon's多样性指数,计算多态性信息含量。

[0075] 在本发明中,使用Popgen32软件计算SSR位点的各项遗传多样性指标。

[0076] 在本发明中,使用GenAIex软件,基于Nei的遗传距离,构建UPGMA聚类树。其中多态性信息含量指数越大说明多态性越高,表明引物为高度多态性引物。

[0077] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0078] 实施例1

[0079] 对来自天津市农业科学院新鲜的猴头菇子实体组织,液氮冷冻后-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱保存。采用Pacbio SMRT Resq测序平台进行了转录组测序。

[0080] 使用MISA软件对猴头菇转录组拼接组装后的unigene序列数据进行SSR位点搜索。采用默认参数设置:单核苷酸重复10次,二核苷酸重复6次,三~六核苷酸分别重复5次。使用Primer3软件对含有SSR位点序列进行批量引物设计,每条SSR位点设计3组引物。参数设定为:退火温度(T<sub>m</sub>)57~63 $^{\circ}$ C,引物长度18bp~27bp,上游引物和下游引物的T<sub>m</sub>差值 $\leq$ 2 $^{\circ}$ C。

[0081] 通过该方式成功设计出120对SSR标记引物,利用3个猴头菇属物种(2号、5号、22号,表3)的DNA模板对120对引物进行了多态性SSR标记的筛选。筛选标准为:引物多态性的PIC值大于0.5,多态性好,特异性强,带型清晰、退火温度相对一致且扩增峰对应的等位基因能将各个品种区分。初步筛选结果显示,有24对引物能成功扩增出清晰的条带且具有良好的重复性。初筛得到的24对引物分别对猴头菇属31份的DNA样品进行PCR扩增,使用毛细管电泳实验来检测产物(见图1~15),筛选出多态性较好的14对引物,序列见表1。由上海生物工程股份有限公司合成。

[0082] 表1SSR引物序列

| 引物名称   | 引物序列 (正向)                               | 引物序列 (反向)                              | 产物长度 (bp) | 荧光标记 |
|--------|-----------------------------------------|----------------------------------------|-----------|------|
| SSR-14 | TTCTCCTCGCTTTTCCGTTA<br>(SEQ ID NO.1)   | AAGAATCCAGACAGCATCCG<br>(SEQ ID NO.2)  | 228       | HEX  |
| SSR-17 | CAGACGGAAAAGCTGAAAGG<br>(SEQ ID NO.3)   | TGAGCTGGTCAGACTTGGTG<br>(SEQ ID NO.4)  | 263       | HEX  |
| SSR-33 | ATTCCAGTCCAGTGTCCAGC<br>(SEQ ID NO.5)   | CCACAGTAATAGCCGACCGT<br>(SEQ ID NO.6)  | 261       | HEX  |
| SSR-56 | GCATTTTCAGCTGGATGGTT<br>(SEQ ID NO.7)   | TCCTACTCACCGCTGTCCTC<br>(SEQ ID NO.8)  | 220       | FAM  |
| SSR-63 | ATGGATCAGCCTGAATGACC<br>(SEQ ID NO.9)   | CACGTCTTGGATCCTGGTTT<br>(SEQ ID NO.10) | 266       | HEX  |
| SSR-67 | CCCCAAAACCTTTGTGACGAT<br>(SEQ ID NO.11) | CCTTACGGCTCGGAATATGA<br>(SEQ ID NO.12) | 133       | FAM  |
| SSR-69 | TCCGTTGAGGATGATGATGA<br>(SEQ ID NO.13)  | TGAGTTGGTCCCAGTTGACA<br>(SEQ ID NO.14) | 174       | FAM  |

|        |        |                                        |                                        |     |     |
|--------|--------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----|-----|
| [0084] | SSR-72 | GGTCCTGGGATAGGACATCA<br>(SEQ ID NO.15) | ATTAATGCGCGGATTGTTTC<br>(SEQ ID NO.16) | 190 | FAM |
|        | SSR-78 | GACCAAAAACACATCGCAGA<br>(SEQ ID NO.17) | AGAGACATTTTCGCGTTCGT<br>(SEQ ID NO.18) | 268 | HEX |
|        | SSR-81 | AGCATTGCTCTCAAGTCCGT<br>(SEQ ID NO.19) | TCATTTCAACACCCTCGTGA<br>(SEQ ID NO.20) | 151 | FAM |
|        | SSR-94 | CACAAACCAAGAAGCGAACA<br>(SEQ ID NO.21) | AGAAAACATACCCCCTCGCT<br>(SEQ ID NO.22) | 234 | HEX |
|        | SSR-95 | CAGCGTCCAAGTCGGTTT<br>(SEQ ID NO.23)   | ACCTCAGATGCCTCAACCAG<br>(SEQ ID NO.24) | 214 | FAM |
|        | SSR-97 | GGACACGGACATGGTGGT<br>(SEQ ID NO.25)   | GCCCAGCGATCGAGTAAATA<br>(SEQ ID NO.26) | 266 | HEX |
|        | SSR-99 | GAGGACGACGACTTCTTTGG<br>(SEQ ID NO.27) | GCTCGTTTCCACCACTGTCT<br>(SEQ ID NO.28) | 271 | HEX |

[0085] 由图1~15可知,猴头菇2号、5号、22号三个品种在五个SSR标记引物(SSR-69、SSR-72、SSR-78、SSR-95、SSR-97)中能稳定扩增出不同的电泳峰谱,对应不同的等位基因,这些标记引物组合能将这三个品种有效区分开来。

[0086] 实施例2

[0087] 基于实施例1合成的SSR引物,应用于猴头菇属遗传多样性聚类分析:

[0088] (1) 提取待测猴头菇基因组DNA;以31份猴头菇样本(表2)验证开发的SSR标记有效性。按照植物基因组DNA提取试剂盒(购自上海生工生物有限公司)的说明提取供试菌株的基因组。

[0089] (2) 按照表1中所对应的荧光标记基因,将每对引物的正向引物加上荧光标记,得到正向荧光引物。

[0090] (3) 以步骤(1)提取的待测样品基因组DNA为模板,以反向引物、正向引物进行PCR扩增,得到荧光PCR扩增产物;其中PCR扩增体系如下:以15 $\mu$ L计,50ng/ $\mu$ L DNA模板1 $\mu$ L、2 $\times$  PCR Mix 7.5 $\mu$ L、10mmol/L的正向荧光引物0.3 $\mu$ L、10mmol/L的反向引物0.3 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 5.9 $\mu$ L。所述PCR扩增的程序如下:98 $^{\circ}$ C预变性3min;94 $^{\circ}$ C变性20s,55~60 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸40s,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5min。最后,将反应体系置于4 $^{\circ}$ C保存。

[0091] (4) 取1 $\mu$ L上述PCR产物加9 $\mu$ L上样,95 $^{\circ}$ C变性3min,立即冰水浴,上测序仪ABI 3730XL进行电泳检测。

[0092] (5) 对毛细管电泳数据进行分析,采用DataFormater、GeneMaker软件进行处理。使用Popgen32软件计算SSR位点的各项遗传多样性指标(结果见表3)。

[0093] 表2供试猴头菇菌株信息

|                     | [0094] |       |            | [0095]       |       |      |
|---------------------|--------|-------|------------|--------------|-------|------|
|                     | 编号     | 原保藏号  | 来源         | 编号           | 原保藏号  | 来源   |
|                     | 1      | 9-12  | 长白山        | 16           | 9-16  | 长白山  |
|                     | 2      | 刺长    | 华中农大       | 17           | 9-7   | 长白山  |
|                     | 3      | 蓟县    | 天津蓟县       | 18           | 9-10  | 小兴安岭 |
|                     | 4      | 东北    | 北京吉覃       | 19           | 9-13  | 长白山  |
|                     | 5      | 华中    | 华中农大       | 20           | Hq    | 福建古田 |
|                     | 6      | D     | 长白山        | 21           | 9-1   | 延吉   |
|                     | 7      | 百菌香   | 福建福州       | 22           | 9-6   | 吉林通化 |
|                     | 8      | 云南    | 云南昆明       | 23           | 9-9   | 长白山  |
|                     | 9      | 花果山   | 连云港        | 24           | 玉冉    | 北京吉覃 |
|                     | 10     | TD    | 延吉         | 25           | He6   | 福建漳州 |
|                     | 11     | 9-8   | 小兴安岭       | 26           | 6-3   | 杂交选育 |
|                     | 12     | 6-2   | 杂交选育       | 27           | 6-11  | 杂交选育 |
|                     | 13     | 9-2   | 大兴安岭       | 28           | 9-4   | 大兴安岭 |
|                     | 14     | 山东    | 山东泰安       | 29           | 9-15  | 长白山  |
|                     |        |       |            | 31           | 9-11  | 延吉   |
| 表3猴头菇属14对SSR位点多态性分析 |        |       |            |              |       |      |
| [0096]              | SSR 位点 | 等位基因数 | Nei' s 基因多 | Shannon' s 多 | 多态信息量 |      |
|                     |        | (Na)  | 样性 (H)     | 样性指数 (I)     | (PIC) |      |

|        |        |     |        |        |         |
|--------|--------|-----|--------|--------|---------|
|        | SSR-14 | 3   | 0.3179 | 0.5468 | 0.2765  |
|        | SSR-17 | 3   | 0.3226 | 0.5785 | 0.2874  |
|        | SSR-33 | 4   | 0.4631 | 0.8225 | 0.4044  |
|        | SSR-56 | 3   | 0.4136 | 0.6867 | 0.3507  |
|        | SSR-63 | 5   | 0.6296 | 1.1469 | 0.5593  |
|        | SSR-67 | 5   | 0.3367 | 0.6678 | 0.30672 |
|        | SSR-69 | 5   | 0.5456 | 0.9669 | 0.4672  |
| [0097] | SSR-72 | 3   | 0.6072 | 0.9993 | 0.5271  |
|        | SSR-78 | 8   | 0.7883 | 1.7589 | 0.7602  |
|        | SSR-81 | 6   | 0.6681 | 1.3649 | 0.6306  |
|        | SSR-94 | 7   | 0.6316 | 1.3332 | 0.5984  |
|        | SSR-95 | 13  | 0.7133 | 1.7113 | 0.6784  |
|        | SSR-97 | 6   | 0.6145 | 1.1442 | 0.5383  |
|        | SSR-99 | 8   | 0.7009 | 1.582  | 0.6747  |
|        | Mean   | 5.6 | 0.5538 | 1.0936 | 0.5043  |

[0098] 由表3可以看出,在31份猴头属样品中,检测到了总共79个多态性位点,每对引物平均含有5.6个多态性位点。 $Nei's$ 基因多样性指数(H)的范围为0.3179~0.7883之间。平均Shannon,s多样性指数(I)为1.0936,14个SSR位点多态性信息含量(PIC)在0.2765~0.7602之间,均值为0.5043,SSR-14位点PIC值最小为0.2756,SSR-78位点PIC值最大为0.7602,14个SSR位点多态性PIC值差距较大。结果表明,所筛选出的引物具有较高的多态性( $PIC > 0.5$ ),适用于猴头菇遗传多样性研究。所选取的猴头菇属样品表现出了较为丰富的遗传多样。

[0099] 为进一步验证该引物组在猴头菇遗传多样性中的应用,对31份猴头菇样本使用GenAIex软件,基于遗传距离,构建UPGMA聚类树,见图16。

[0100] 遗传距离结果表明,7株人工栽培菌株里,有5株相似度极高,可认为来源同一个品种,说明市场上销售的猴头菇菌种存在着同株不同名的现象。野生采集品种里也存在亲缘关系较近的菌株。31个猴头菇之间的遗传距离为0.23~0.98,当遗传距离为0.3时分为6类:猴头菇9-19和猴头菇9-6、猴头菇9-1、猴头菇9-18各自为1个类群;猴头菇Hq、华中、东北、蓟县、百菌香、云南、花果山7个菌株可分为1类;其他20个菌株可分聚为一类。

[0101] 基于PacBio SMRT测序猴头菇全长转录组信息开发了SSR标记,利用有多态性的SSR标记对31个不同来源的猴头菇属材料进行了多态性分析及遗传多样性分析。筛选出多态性较高的14对引物,共检测到了79个等位基因位点,平均Shannon's信息指数(I)为1.0936,平均 $Nei's$ 基因多样性指数(H)为0.5538,表明猴头菇属种质遗传多样性较丰富。聚类分析表明,遗传相似系数在0.23~0.98之间,遗传变异幅度相对适中,但聚类分支较为明显,在遗传距离为0.3处,将31样品分为6个群类,每个样本可以明确区分。

[0102] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

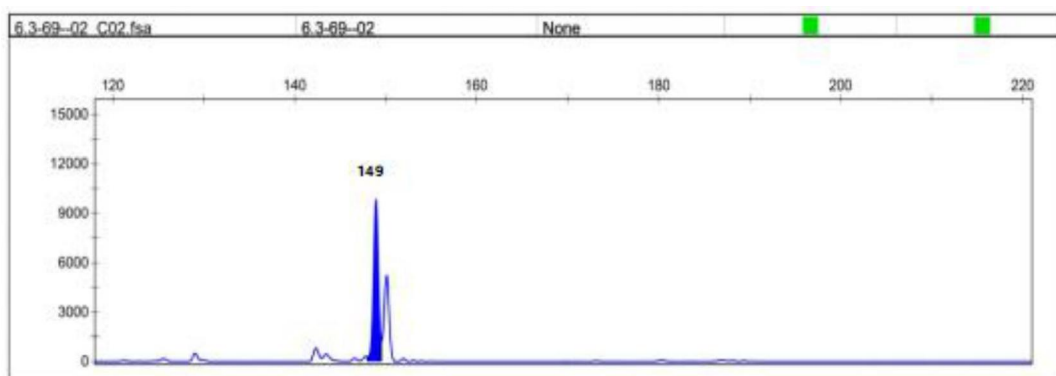


图1

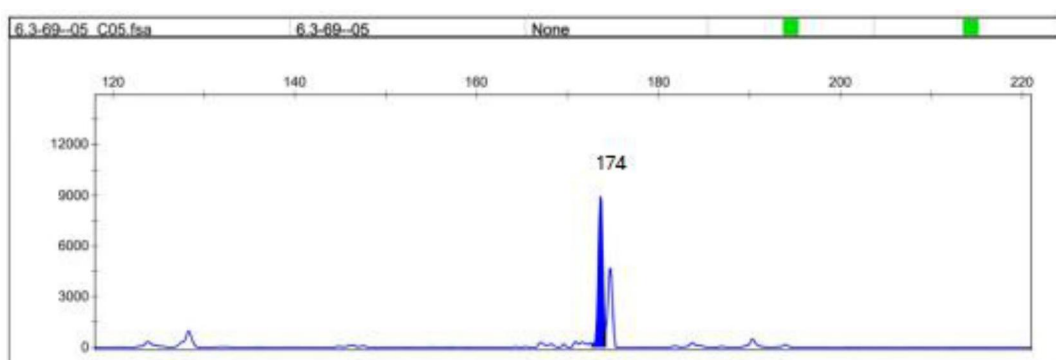


图2

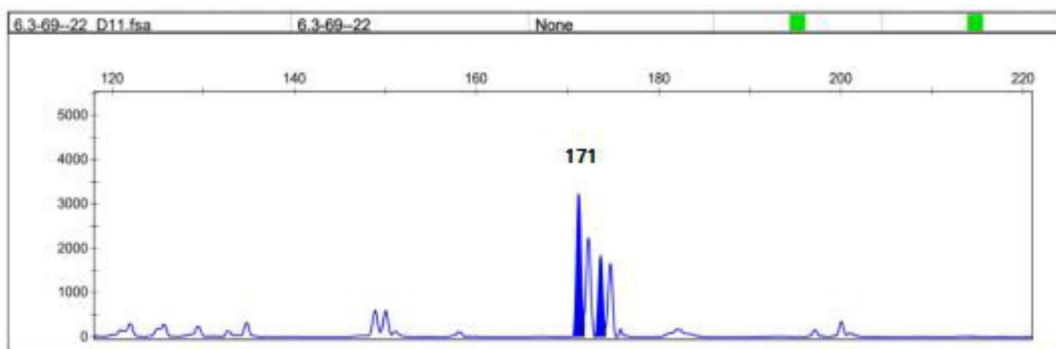


图3

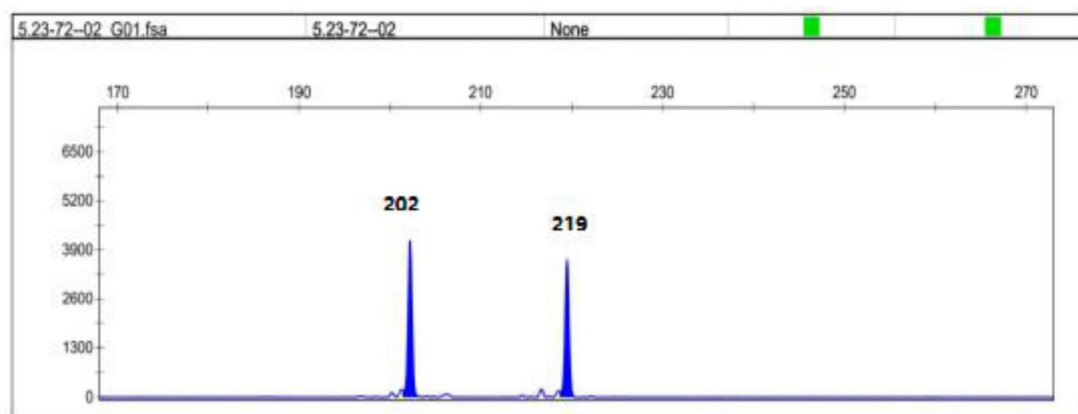


图4

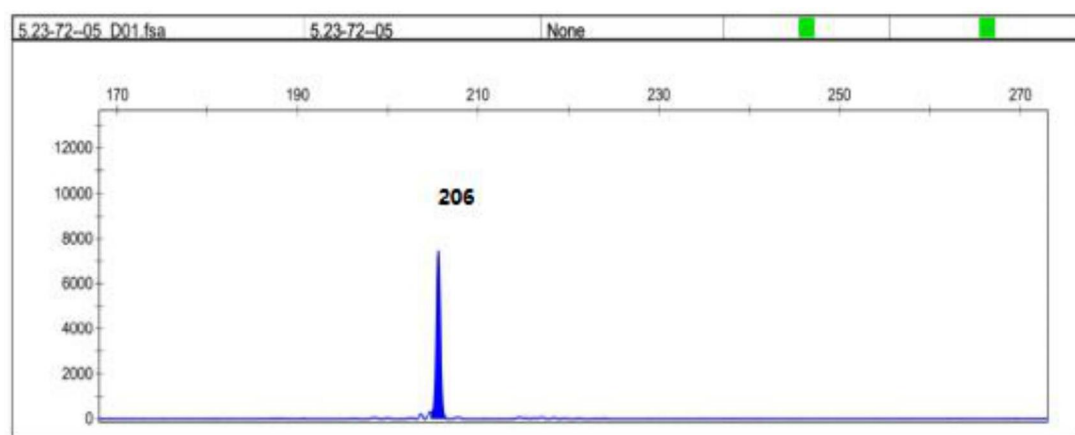


图5

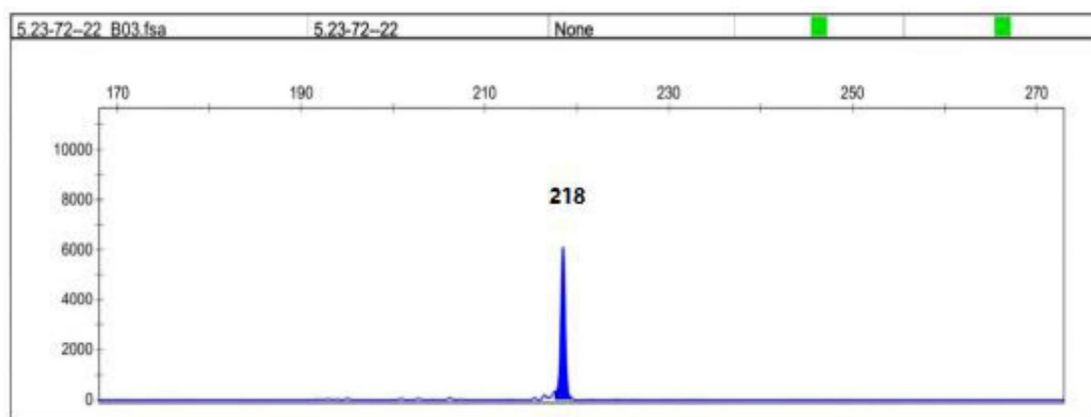


图6

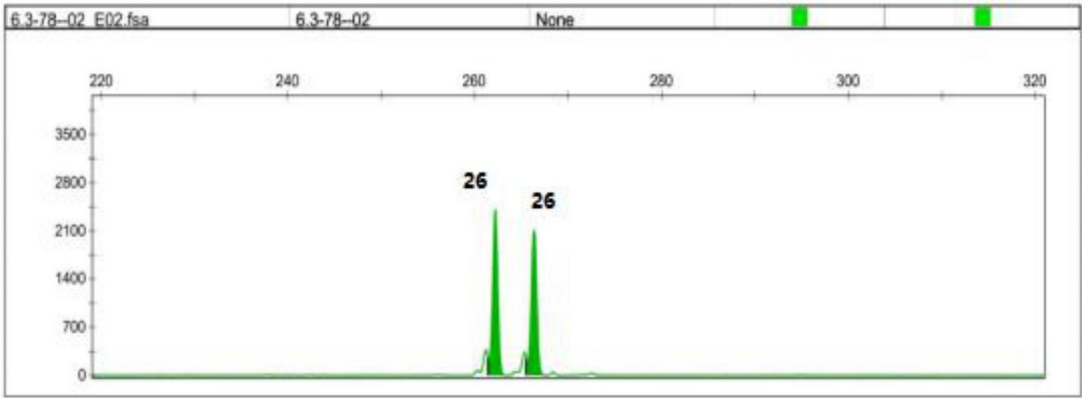


图7

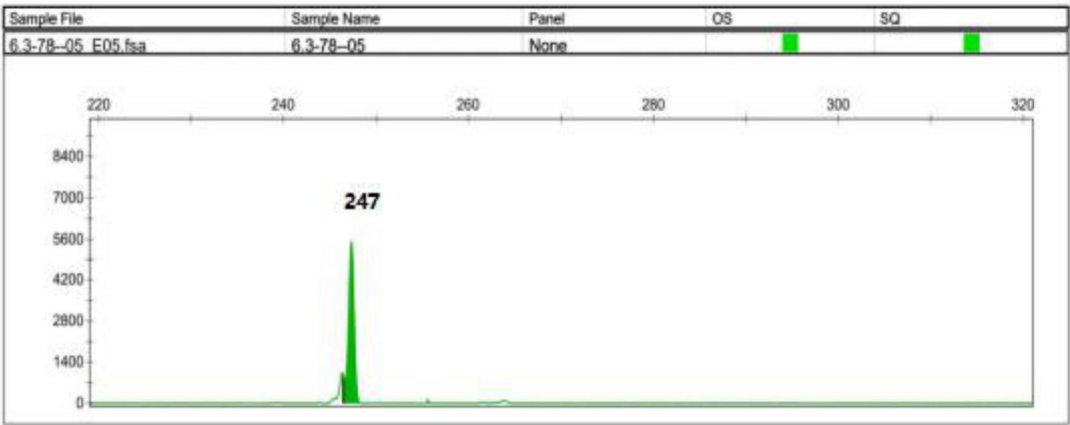


图8

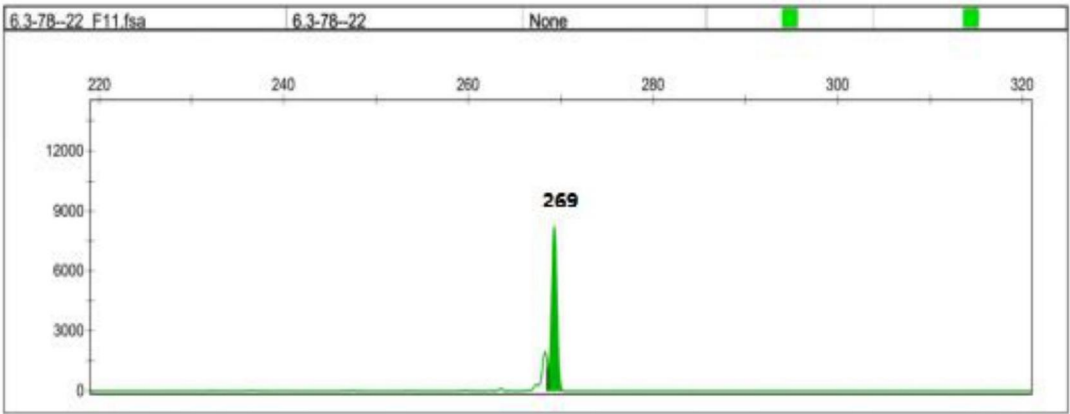


图9

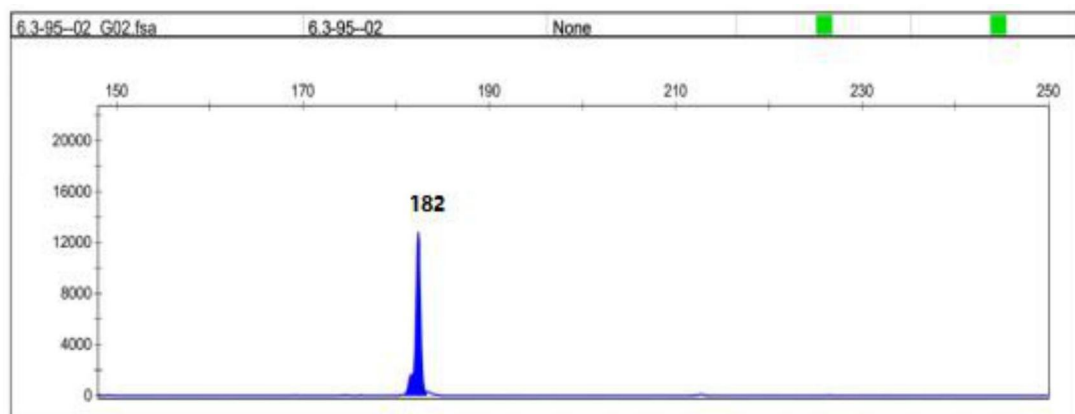


图10

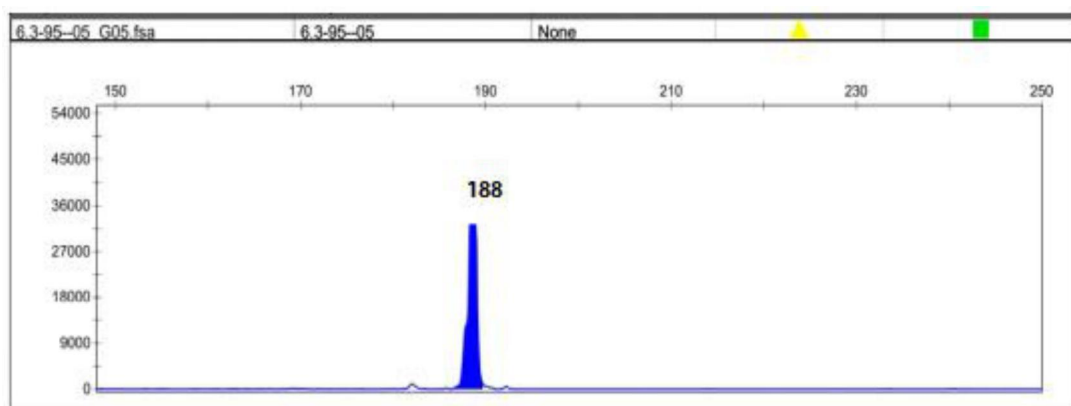


图11

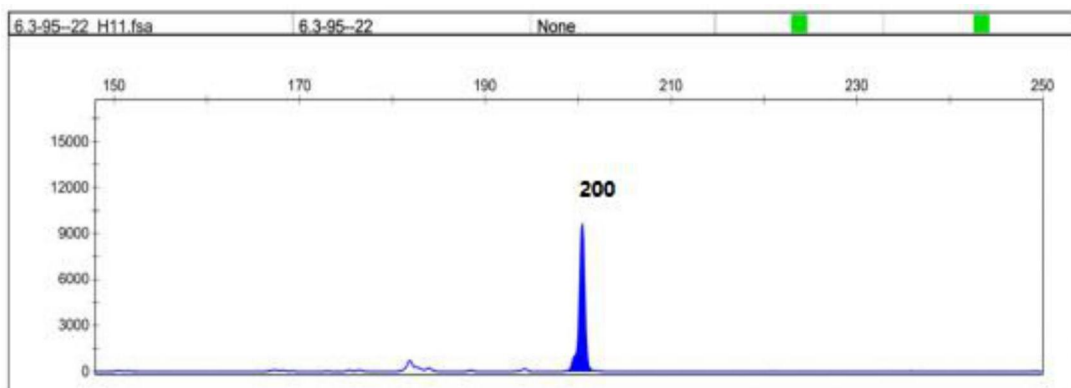


图12

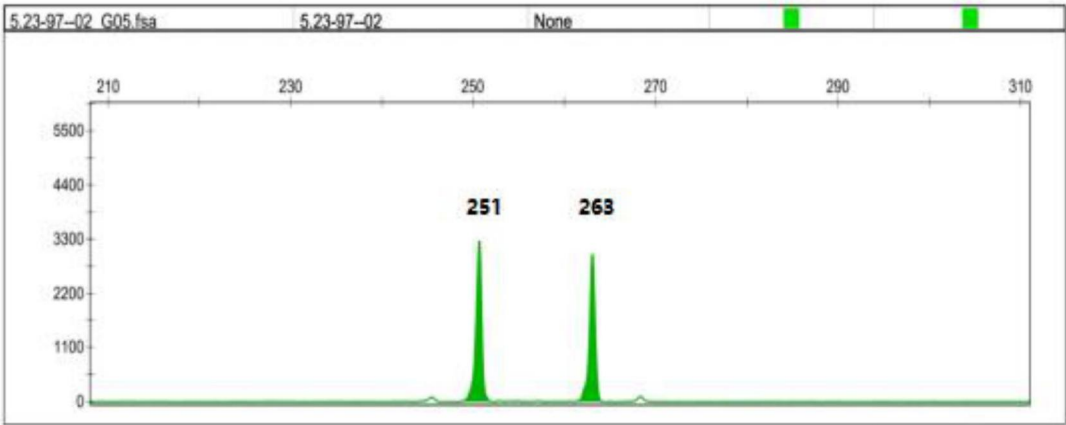


图13

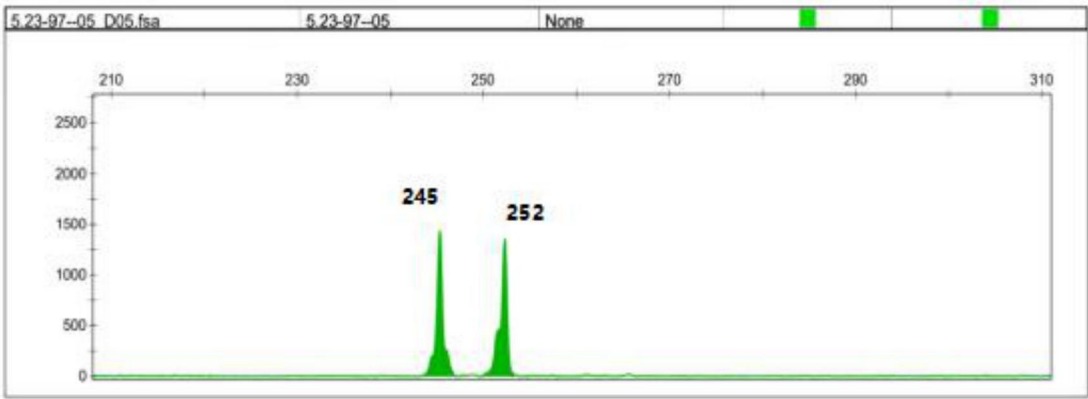


图14

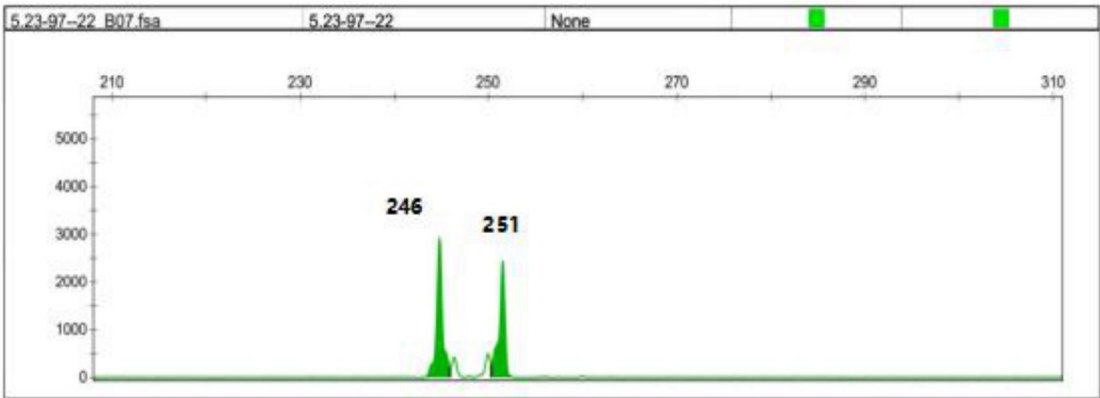


图15

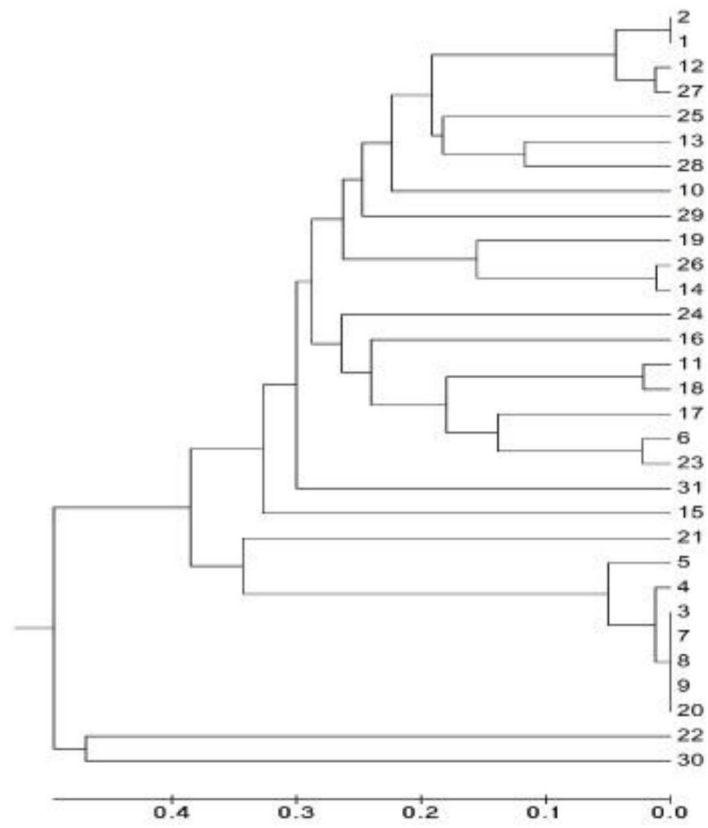


图16