



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105316329 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201510808205. 7

(22) 申请日 2015. 11. 20

(71) 申请人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路 132 号

(72) 发明人 刘晓斌 李静 冯邦 杨祝良

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108

代理人 谢嘉

(51) Int. Cl.

C12N 15/11(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

C12Q 1/04(2006. 01)

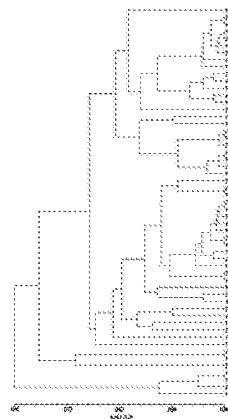
权利要求书3页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

金针菇 SSR 分子标记及其对应引物与应用

(57) 摘要

本发明提供金针菇 SSR 分子标记及其对应引物与应用, 金针菇 SSR 分子标记为序列表中 SEQIDNO:1 至 SEQIDNO:13 中的任意一个 SSR 位点; 金针菇 SSR 分子标记位点两端的侧翼序列上开发的金针菇 SSR 引物具有序列表中 SEQIDNO:14 至 SEQIDNO:39 中所示的碱基序列。在已有金针菇基因组的基础上利用生物信息学方法对其基因组 SSR 位点进行检测并开发引物, 利用不同金针菇菌株对这些 SSR 位点进行筛选后得到 13 对多态性较高的 SSR 分子标记, 上述 SSR 分子标记可用于金针菇的种质资源鉴定、保护及品种选育。



1. 金针菇 SSR 分子标记,其特征在于其为序列表中 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:13 中的任意一个 SSR 位点。

2. 在权利要求 1 所述的金针菇 SSR 分子标记位点两端的侧翼序列上的金针菇 SSR 引物,其特征在於所述的金针菇 SSR 引物具有序列表中 SEQ ID NO:14 至 SEQ ID NO:39 中所示的碱基序列。

3. 如权利要求 1 所述的金针菇 SSR 分子标记,其特征在於所述金针菇 SSR 分子标记 13 个 SSR 位点在 55 个金针菇样品中的等位基因数 N_a 为 2-8 个,平均 4.2 个,香浓多样性指数 I 平均值为 0.821,观测杂合度 H_o 平均值为 0.401,期望杂合度 H_e 平均值为 0.455,多态性信息含量 PIC 平均值为 0.426,13 个 SSR 位点在金针菇样本中具有较高的多态性。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的金针菇 SSR 分子标记或金针菇 SSR 引物,其特征在於所述的金针菇 SSR 分子标记及对应 SSR 引物的核苷酸序列为表 1,

表 1 SSR 位点及引物序列

SSR 位点	SSR 位点序列	正向引物序列	反向引物序列
SSR2	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
SSR7	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17
SSR15	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19
SSR21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
SSR22	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23
SSR23	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25
SSR32	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27
SSR45	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29
SSR87	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31
SSR95	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33
SSR107	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:35
SSR124	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:37
SSR133	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39

5. 权利要求 1 所述的金针菇 SSR 分子标记的开发方法,其特征在於该方法包括下述步骤:用生物信息学方法检测金针菇基因组序列中的 SSR 序列,选取部分 SSR 序列进行引物开发,运用不同金针菇菌株进行 SSR 位点的筛选,筛选出 13 对多态性较高的 SSR 分子标记,上述 SSR 标记及对应引物的核苷酸序列为表 1,

表 1 SSR 位点及引物序列

SSR 位点	SSR 位点序列	正向引物序列	反向引物序列
SSR2	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
SSR7	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17
SSR15	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19
SSR21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
SSR22	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23
SSR23	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25
SSR32	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27
SSR45	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29
SSR87	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31
SSR95	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33
SSR107	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:35
SSR124	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:37
SSR133	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39

6. 权利要求 1 所述的金针菇 SSR 分子标记和权利要求 2 所述的金针菇 SSR 引物在鉴别金针菇不同品种中的应用。

7. 如权利要求 6 所述的应用,其特征在于所述应用是用已有的金针菇基因组序列,用生物信息学方法检测其中的 SSR 位点,选取部分 SSR 位点进行引物开发,用不同种类金针菇菌株进行 SSR 位点筛选出多态性较高的 SSR 分子标记,用不同 SSR 位点的荧光引物对不同种类的金针菇菌株的 DNA 进行 PCR 扩增,然后将 PCR 产物用 ABI3730 设备进行毛细管电泳,用 Genemapper 软件分析 SSR 数据,通过对 SSR 数据比对鉴定出不同种类的金针菇菌株。

8. 对金针菇不同菌株进行鉴定的 SSR 标记及引物开发的方法,其特征在于该方法包括下述步骤:用软件 MISA 和 Primer3 设计金针菇基因组 SSR 位点及其引物,用改良的 CTAB 法提取金针菇 DNA,将所设计的 SSR 引物对金针菇 DNA 进行 PCR 扩增、检测。

9. 如权利要求 8 所述的对金针菇不同菌株进行鉴定的 SSR 标记方法,其特征在于该方法具体包括下述步骤:

金针菇基因组 SSR 位点开发及引物设计:从 NCBI 上下载金针菇基因组数据,运用软件 MISA 对其基因组 SSR 位点进行检测,运用软件 Primer3 对被检测到的 SSR 位点在其上游及下游 200bp 范围内进行引物开发,引物开发条件为:引物长度在 18bp-23bp 之间,引物 TM 值在 57-62 之间,GC 含量在 30% -70% 之间;

金针菇基因组提取及检测:其中总 DNA 提取用改进的 CTAB 法:

(1) 用接种刀刮取培养皿中的菌丝,放于 2ml 离心管中,加入少量石英砂、PVP 和 350 μ l 在 65 $^{\circ}$ C 下预热的 4 \times CTAB 提取液,提取液内含 0.2% 的 β -巯基乙醇,研磨,菌丝磨匀后,再加入上述 4 \times CTAB 提取液 400 μ l 振荡混匀,在 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中温浴 2~4h,30min 摇匀一次;

(2) 将温浴材料取出置于室温下,待其冷却到室温后加入 750 μ l 24:1 氯仿-异戊醇,摇匀,12000r/min 下离心 10min;

(3) 将上清液转移到一新的 2ml 离心管中,加入等体积的氯仿-异戊醇,摇匀,12000r/min 下离心 10min;

(4) 将上清液转移到一新的 2ml 离心管中,加入 80% 体积的异丙醇,预冷至 -20 $^{\circ}$ C,充分混匀,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 1~2h;

(5) 自冰箱中取出,恢复到室温后,12000r/min 下离心 15min,弃上清液;

(6) 用 500 μ l 的 70%的乙醇和无水乙醇各冲洗 1~2 次,每次 12000r/min 室温离心 1min 后弃上清液,然后将离心管置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中约 20~30min,使乙醇充分挥发,或者开盖使其自然干燥,干燥后加入灭菌的蒸馏水;

(7) 用核酸浓度检测仪检测 DNA 浓度,将浓度调节至 100ng/ μ l,置于 -20 $^{\circ}$ C 保存;

SSR 位点的 PCR 扩增检测:从上述筛选到的 SSR 位点中随机选取 124 个位点对 8 个不同来源的金针菇菌株进行初步筛选,检测扩增条带的有无,PCR 反应体系为:100ng/ μ l 的 DNA 模板 1 μ l, 25mg/ml BSA 1 μ l, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ l, dNTP 10mm 0.5 μ l, 正向引物 5um 1 μ l, 反向引物 5um 1 μ l, Taq 酶 0.3 μ l, ddH₂O 15.7 μ l, PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C :4min, (94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s) \times 35cycles, 72 $^{\circ}$ C 8min, PCR 产物点样于 1%浓度的琼脂糖胶中,放入 1 \times TAE 缓冲液中进行电泳检测,经检测有 109 对引物在 8 个金针菇菌株中扩增出清晰明亮的条带,从中选取 13 对引物进行荧光引物合成,后将 13 对荧光引物及 55 个金针菇菌株 DNA 样品进行荧光引物扩增,并用 ABI3730x1 设备检测扩增产物,使用 Genemapper 软件分析、记录 SSR 数据;

SSR 位点遗传多样性信息计算:将获得的 SSR 数据运用 PopGene32 和 PIC_CALC 软件进行各位点的遗传多样性指标及多态性信息含量计算,结果如表 2,13 个 SSR 位点在 55 个金针菇样品中的等位基因数 Na 为 2-8 个,平均 4.2 个,香浓多样性指数 I 平均值为 0.821,观测杂合度 Ho 平均值为 0.401,期望杂合度 He 平均值为 0.455,多态性信息含量 PIC 平均值为 0.426,结果表明 13 个 SSR 位点在金针菇样本中具有较高的多态性;用软件 NTsys2.10e 构建样品间的 UPGMA 树,结果如图 1,13 个 SSR 位点将 55 个金针菇菌株区分开,

表 2 13 个微卫星位点的遗传多样性信息

Locus	Na	I	Ho	He	PIC
SSR7	4	1.088	0.745	0.610	0.564
SSR2	4	1.05	0.564	0.591	0.544
SSR15	2	0.632	0.400	0.440	0.359
SSR21	7	1.461	0.436	0.691	0.713
SSR22	8	1.357	0.455	0.681	0.649
SSR23	3	0.599	0.418	0.359	0.364
SSR32	8	1.294	0.236	0.592	0.567
SSR45	3	0.835	0.455	0.491	0.432
SSR87	3	0.752	0.400	0.481	0.399
SSR124	4	0.815	0.436	0.507	0.437
SSR133	6	0.856	0.200	0.409	0.434
SSR95	3	0.752	0.600	0.481	0.415
SSR107	6	0.629	0.309	0.277	0.374
Mean	4.15	0.821	0.401	0.455	0.426

金针菇 SSR 分子标记及其对应引物与应用

技术领域：

[0001] 本发明属于分子生物学 DNA 分子标记技术领域，具体涉及对金针菇不同菌株进行鉴定的 SSR 标记方法，金针菇 SSR 分子标记及其对应引物序列的开发与应用。

背景技术：

[0002] 金针菇 *Flammulina velutipes* 隶属于膨瑚菌科 Physalacriaceae 冬菇属 *Flammulina*，是我国主要栽培食用菌种类之一，2012 年我国金针菇年产量 240 万吨，居世界第一位。然而，目前我国金针菇产业大而不强，菌种问题成为金针菇产业发展的瓶颈，具体表现为：在实际生产过程中常出现各单位引种途径不一，引种后各自取名、各自编号，出现很多同物异名现象。不合理的引种、育种往往造成品种质量低劣，损害菇农利益，侵犯品种权（张金霞等，2004；冯作山，2010）。为规范菌种开发和保护，开发一套快速有效的鉴别金针菇不同品种的方法已成为当务之急。

[0003] 目前，基于 DNA 序列的分子标记方法是 DNA 水平遗传多态性的直接反应，能有效对近缘种或种下不同个体进行准确鉴别 (Freeland, 2005)。相较于其它分子标记方法，SSR 分子标记具有广泛分布于基因组的编码区及非编码区、共显性、多态性高、稳定性好、易于扩增等优点。随着越来越多的物种的基因组被测序，基于基因组序列，运用生物信息学的方法从基因组中直接开发 SSR 标记克服了基于实验手段开发 SSR 标记费时费力的缺点，该方法成为目前开发 SSR 标记的主流方法。因此，利用已有的金针菇基因组数据开发高分辨率的 SSR 标记对金针菇种质资源鉴定、保护及品种选育具有重要意义。

发明内容：

[0004] 本发明的目的在于提供一种对金针菇不同菌株进行准确鉴定的 SSR 标记方法，该方法为金针菇的种质资源鉴定、保护及品种选育提供有力工具。

[0005] 为了实现本发明的上述目的，本发明提供了如下的技术方案：

[0006] 金针菇 SSR 分子标记，其为序列表中 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:13 中的任意一个 SSR 位点。

[0007] 在所述的金针菇 SSR 分子标记位点两端的侧翼序列上的金针菇 SSR 引物，其具有序列表中 SEQ ID NO:14 至 SEQ ID NO:39 中所示的碱基序列。

[0008] 如所述的金针菇 SSR 分子标记，其中所述金针菇 SSR 分子标记 13 个 SSR 位点在 55 个金针菇样品中的等位基因数 N_a 为 2-8 个，平均 4.2 个，香浓多样性指数 I 平均值为 0.821，观测杂合度 H_o 平均值为 0.401，期望杂合度 H_e 平均值为 0.455，多态性信息含量 PIC 平均值为 0.426，13 个 SSR 位点在金针菇样本中具有较高的多态性。

[0009] 如所述的金针菇 SSR 分子标记和金针菇 SSR 引物，其中所述的金针菇 SSR 分子标记及对应 SSR 引物的的核苷酸序列如表 1，

[0010] 表 1 SSR 位点及引物序列

[0011]

SSR 位点	SSR 位点序列	正向引物序列	反向引物序列
SSR2	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
SSR7	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17
SSR15	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19
SSR21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
SSR22	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23
SSR23	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25
SSR32	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27
SSR45	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29
SSR87	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31
SSR95	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33
SSR107	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:35
SSR124	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:37
SSR133	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39

[0012] 所述的金针菇 SSR 分子标记的开发方法,包括下述步骤:用生物信息学方法检测金针菇基因组序列中的 SSR 序列,选取部分 SSR 序列进行引物开发,运用不同金针菇菌株进行 SSR 位点的筛选,最终筛选出 13 对多态性较高的 SSR 分子标记,上述 SSR 标记及对应引物的核苷酸序列如表 1。

[0013] 本发明还提供了所述的金针菇 SSR 分子标记和金针菇 SSR 引物在鉴别金针菇不同品种中的应用。

[0014] 所述应用是利用现有的金针菇基因组序列,用生物信息学方法检测其中的 SSR 位点,选取部分 SSR 位点进行引物开发,用不同种类金针菇菌株进行 SSR 位点筛选出多态性较高的 SSR 分子标记,通过运用不同 SSR 位点的荧光引物对不同种类的金针菇菌株的 DNA 进行 PCR 扩增,然后将 PCR 产物运用 ABI3730 设备进行毛细管电泳,使用 Genemapper 软件分析 SSR 数据,通过对 SSR 数据比对鉴定出不同种类的金针菇菌株。

[0015] 对金针菇不同菌株进行鉴定的 SSR 标记及引物开发的方法,该方法包括下述步骤:运用软件 MISA 和 Primer3 设计金针菇基因组 SSR 位点及其引物,运用改良的 CTAB 法提取金针菇 DNA,将所设计的 SSR 引物对金针菇 DNA 进行 PCR 扩增、检测。

[0016] 如所述的对金针菇不同菌株进行鉴定的 SSR 标记方法,该方法具体包括下述步骤:

[0017] 所述的金针菇基因组 SSR 位点开发及引物设计是从 NCBI 上下载金针菇基因组数据,运用软件 MISA 对其基因组 SSR 位点进行检测,运用软件 Primer3 对被检测到的 SSR 位点在其上游及下游 200bp 范围内进行引物开发,引物开发条件为:引物长度在 18bp-23bp 之间,引物 TM 值在 57-62 之间,GC 含量在 30%-70%之间。

[0018] 所述的金针菇基因组提取及检测中总 DNA 提取用改进的 CTAB 法:

[0019] (1) 用接种刀刮取培养皿中的菌丝,放于 2ml 离心管中,加入少量石英砂、PVP 和

350 μ l 在 65 $^{\circ}$ C 下预热的 4 \times CTAB 提取液,提取液内含 0.2%的 β -巯基乙醇,研磨,菌丝磨匀后,再加入上述 4 \times CTAB 提取液 400 μ l 振荡混匀,在 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中温浴 2~4h,30min 摇匀一次;

[0020] (2) 将温浴材料取出置于室温下,待其冷却到室温后加入 750 μ l 24 : 1 氯仿 - 异戊醇,摇匀,12000r/min 下离心 10min;

[0021] (3) 将上清液转移到一新的 2ml 离心管中,加入等体积的氯仿 - 异戊醇,摇匀,12000r/min 下离心 10min;

[0022] (4) 将上清液转移到一新的 2ml 离心管中,加入 80%体积的异丙醇,预冷至 -20 $^{\circ}$ C,充分混匀,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 1~2h;

[0023] (5) 自冰箱中取出,恢复到室温后,12000r/min 下离心 15min,弃上清液;

[0024] (6) 用 500 μ l 的 70%的乙醇和无水乙醇各冲洗 1~2 次,每次 12000r/min 室温离心 1min 后弃上清液,然后将离心管置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中约 20~30min,使乙醇充分挥发,或者开盖使其自然干燥,干燥后加入灭菌的蒸馏水;

[0025] (7) 用核酸浓度检测仪检测 DNA 浓度,将浓度调节至 100ng/ μ l,置于 -20 $^{\circ}$ C 保存;

[0026] 所述的 SSR 位点的 PCR 扩增检测是从上述筛选到的 SSR 位点中随机选取 124 个位点对 8 个不同来源的金针菇菌株进行初步筛选,检测扩增条带的有无,PCR 反应体系为: 100ng/ μ l 的 DNA 模板 1 μ l, 25mg/ml BSA 1 μ l, 10 \times PCRBuffer 2.5 μ l, dNTP 10mm 0.5 μ l, 正向引物 5um 1 μ l, 反向引物 5um 1 μ l, Taq 酶 0.3 μ l, ddH₂O 15.7 μ l, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C :4min, (94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s) \times 35cycles, 72 $^{\circ}$ C 8min, PCR 产物点样于 1%浓度的琼脂糖胶中,放入 1 \times TAE 缓冲液中进行电泳检测,经检测有 109 对引物在 8 个金针菇菌株中扩增出清晰明亮的条带,从中选取 13 对引物进行荧光引物合成,后将 13 对荧光引物及 55 个金针菇菌株 DNA 样品进行荧光引物扩增,并用 ABI3730x1 设备检测扩增产物,使用 Genemapper 软件分析、记录 SSR 数据;

[0027] 所述的 SSR 位点遗传多样性信息计算是将获得的 SSR 数据运用 PopGene32 和 PIC_CALC 软件进行各位点的遗传多样性指标及多态性信息含量计算,结果如表 2, 13 个 SSR 位点在 55 个金针菇样品中的等位基因数 Na 为 2-8 个,平均 4.2 个,香浓多样性指数 I 平均值为 0.821,观测杂合度 Ho 平均值为 0.401,期望杂合度 He 平均值为 0.455,多态性信息含量 PIC 平均值为 0.426,结果表明 13 个 SSR 位点在金针菇样本中具有较高的多态性;用软件 Ntsys 2.10e 构建样品间的 UPGMA 树,结果如图 1, 13 个 SSR 位点将 55 个金针菇菌株区分开,

[0028] 表 2 13 个微卫星位点的遗传多样性信息

[0029]

Locus	Na	I	Ho	He	PIC
SSR7	4	1.088	0.745	0.610	0.564
SSR2	4	1.05	0.564	0.591	0.544
SSR15	2	0.632	0.400	0.440	0.359
SSR21	7	1.461	0.436	0.691	0.713
SSR22	8	1.357	0.455	0.681	0.649
SSR23	3	0.599	0.418	0.359	0.364
SSR32	8	1.294	0.236	0.592	0.567
SSR45	3	0.835	0.455	0.491	0.432
SSR87	3	0.752	0.400	0.481	0.399
SSR124	4	0.815	0.436	0.507	0.437
SSR133	6	0.856	0.200	0.409	0.434
SSR95	3	0.752	0.600	0.481	0.415

[0030]

SSR107	6	0.629	0.309	0.277	0.374
Mean	4.15	0.821	0.401	0.455	0.426

[0031] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:本发明利用现有的金针菇基因组序列,运用生物信息学方法检测其中的 SSR 序列,选取部分 SSR 序列进行引物开发,运用来自全国不同科研单位及公司的不同金针菇菌株进行 SSR 位点的筛选,最终筛选出 13 对多态性较高的 SSR 分子标记。提供了一种对金针菇不同菌株进行准确鉴定的 SSR 标记方法,开发出金针菇 SSR 分子标记,为金针菇的种质资源鉴定、保护及品种选育提供有力工具。

附图说明:

[0032] 图 1 为基于 13 个 SSR 位点对 55 个金针菇菌株构建的 UPGMA 树。

具体实施方式:

[0033] 下面结合附图,用本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此来限定本发明。

[0034] 实施例 1:

[0035] 本发明的序列表中 1-13 为金针菇基因组 SSR 位点 SSR2、SSR7、SSR15、SSR21、SSR22、SSR23、SSR32、SSR45、SSR87、SSR95、SSR107、SSR124、SSR133 的核苷酸序列(分别为 SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:13);

[0036] 序列表中 14-40 为金针菇基因组 SSR 位点的引物 SSR2-F、SSR2-R、SSR7-F、SSR7-R、SSR15-F、SSR15-R、SSR21-F、SSR21-R、SSR22-F、SSR22-R、SSR23-F、SSR23-R、SSR32-F、SSR32-R、SSR45-F、SSR45-R、SSR87-F、SSR87-R、SSR95-F、SSR95-R、SSR107-F、SSR107-R、SSR124-F、SSR124-R、SSR133-F、SSR133-R 的核苷酸序列(分别为 SEQ ID NO:14-SEQ ID NO:39)。

[0037] 1. 金针菇基因组 SSR 位点及引物开发:

[0038] 从 NCBI 上下载金针菇基因组数据,运用软件 MISA 对其基因组 SSR 位点进行检测,运用软件 Primer 3 对被检测到的 SSR 位点在其上游及下游 200bp 范围内进行引物开发,引

物开发条件为：引物长度在 18bp-23b 之间，引物 TM 值在 57-62 之间，GC 含量在 30% -70% 之间。

[0039] 2. 金针菇基因组提取及检测：

[0040] 总 DNA 提取采用改进的 CTAB 法，具体操作步骤如下：

[0041] (1) 用接种刀刮取培养皿中的菌丝，放于 2ml 离心管中，加入少量石英砂、PVP 和 350 μ l 在 65 $^{\circ}$ C 下预热的 4 \times CTAB 提取液（内含 0.2% 的 β -巯基乙醇）研磨，菌丝磨匀后，再加入上述 4 \times CTAB 提取液 400 μ l 振荡混匀，在 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中温浴 2 ~ 4h (30min 摇匀一次)；

[0042] (2) 将温浴材料取出置于室温下，待其冷却到室温后加入 750 μ l 氯仿 - 异戊醇 (24 : 1)，摇匀，12000r/min 下离心 10min；

[0043] (3) 将上清液转移到一新的 2ml 离心管中，加入等体积的氯仿 - 异戊醇，摇匀，12000r/min 下离心 10min；

[0044] (4) 将上清液转移到一新的 2ml 离心管中，加入 80% 体积的异丙醇（预冷至 -20 $^{\circ}$ C），充分混匀，于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 1 ~ 2h；

[0045] (5) 自冰箱中取出，恢复到室温后，12000r/min 下离心 15min，弃上清液；

[0046] (6) 用 500 μ l 的 70% 的乙醇和无水乙醇各冲洗 1 ~ 2 次，每次 12000r/min 室温离心 1min 后弃上清液，然后将离心管置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中约 20 ~ 30min，使乙醇充分挥发（也可以开盖使其自然干燥）。干燥后加入灭菌的蒸馏水。

[0047] (7) 用核酸浓度检测仪检测 DNA 浓度，将浓度调节至 100ng/ μ l，置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0048] 3. SSR 位点的 PCR 扩增检测：

[0049] 从上述筛选到的 SSR 位点中随机选取 124 个位点对 8 个不同来源的金针菇菌株进行初步筛选，检测扩增条带的有无。PCR 反应体系为：100ng/ μ l 的 DNA 模板 1 μ l，25mg/ml BSA 1 μ l，10 \times PCR Buffer 2.5 μ l，dNTP (10mm) 0.5 μ l，正向引物 (5 μ m) 1 μ l，反向引物 (5 μ m) 1 μ l，Taq 酶 0.3 μ l，ddH₂O 15.7 μ l。PCR 反应条件为：94 $^{\circ}$ C:4min，(94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s) \times 35cycles, 72 $^{\circ}$ C 8min。PCR 产物点样于 1% 浓度的琼脂糖胶中，放入 1 \times TAE 缓冲液中进行电泳检测。经检测发现有 109 对引物可在 8 个金针菇菌株中扩增出清晰明亮的条带，从中选取 13 对引物进行荧光引物合成，后将 13 对荧光引物及 55 个金针菇菌株 DNA 样品送至昆明硕擎生物科技有限公司进行荧光引物扩增，并用 ABI3730x1 设备检测扩增产物，使用 Genemapper 软件分析、记录 SSR 数据。

[0050] 所述的 SSR 标记及对应引物的核苷酸序列如下：

[0051] SSR2, 由 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列组成：

[0052] CATGTTCTCCTCCGTCGTCGACGTTTCATCAAGGAGTTGGTGCACGCTCCTAAACCTATCGTCGAACATG
AGCCCCGTTTGTCTTCTCAGGCGTCTACGTCCATCGCCGAGCTGCACGCTCCTAAAACCGTGGTCGAGCCCGAGGTC
AACCTTGACTTCTGCATGAACTGGTTCCAGGACAAAGAATACGAAGACGAGGACGAAGAAGAAGAAGAAGAAGA
AGAAGAAGAGTTTCGACGACGACGCCACCTGCGCTGGATCCCCGCTGAATGGCAACAACCAGCTCACGAGCATGTCC
TTCCTCGCATGGATCTTCTCGACAAGTCGAGTTCACAGCGTCGTCATCAAGAACGCTCCAGTAGTCCCGGAATAT
ACAGCCCTCCCGTCCCCCCTTACCATCACCTTTGCCCGTTCCTTCGCCACA

[0053] SSR7, 由 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列组成：

[0054] AAACGGAGAGTATTTTGGAGCGCCTTGGTATATGGGTGGTAAGTAGCCTAGTTCCAGCCATAGGTACGCT

AATCCGCTTGTTTCATGTATGGTAGCGCGCTTCCCGAAGATTTTGTGCGAGAAACGATTCCACCTTTCCTTTGTCTCCC
GCATCCTCGTCAGATGAAAAATAATTCGGAGCCACCGCCACCTCCCTTACCACGACCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCC
TCTACCTTTGGTTCCGGTGCCTGTGAAAATGAATCAACCTGCGATGAGCATGAGGGCTCGGACATATATTGACTT
ACACGAGTGACGCGAAGTGGCGAAGCCATAACGAGGGAGACGCTAGCGCCAAAAGCATGAAATACAGAGTCGATGT
TCGCATCCTTGTTATAGTTAATCGACCAGCGATATAGACGATGCAGA

[0055] SSR15, 由 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列组成:

[0056] ATCTTTGCTAGTGATGACGAGGACAGTGACGACGAGGGGGCGACTGAATCTAAGAAGGACGAGATGGAC
GTCGACGAACCCCCACTAGAAAAGCCGAAGCCGATCTTCCCGGATGAACCTGTTGATATCAACACATTCAAACCGAC
CTTCATACCGCGCGAAGGAAAAGGCGAAGGAACGAGACTCTGAAAAGGATCCGGCGAAGAAGAAGAAGAAGAAAG
ACAAGGAGAAGAAGAAGGTTCTGGTTTCGTTTGTATGGAGGAGGAAGGAGGTGCAGACGTTGCTCCTACTCCAAAG
AAGAAGAGACGGAAAACAAAACAGGAGTGCAGACGATGACTCGATGTGGGTGGAGAAAGCTCCCCACCTATCGT
GGCGTCTACTTTGCCATCAACCTTAGGGACCGATTCGGCGGACG

[0057] SSR21, 由 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列组成:

[0058] ATTCAGGCCTCCGGTTCATGATACTTCTCTCAGCAGCCAACCGCGCGCAGCCTCAACGATTTT
TCCTTCATCTCGTCCCCGAGGCCTTCAAACCGGTTCCGTCTCGGTTCCCTTGGTCCGTCGTCTGCGCTTTCAAAGC
CAAGAGTCGTTTTCTTAGATCTTCTGTTCGAAGCTGATCCTTGGCTTTGCGATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
GGGTTGGAGGCTGAACGGGAAGGGGATCTTCCCTCCCCTTGCCCTTGACCTTGAGATGGGCGTGAAGTGACTCCAGT
GCGCTGCGCGGGGACGTTTTGGGCGGTCCGGGAGAGGGAGAGGGGGCGTGTCTGGAGGAAGAGGCGGTGTGTCTAG
GTCTAGAGGAAGAGACAGGTGCGGTGACGAGGATCTCCTGTGCC

[0059] SSR22, 由 SEQ ID NO:5 所示的核苷酸序列组成:

[0060] CCGTCGATGGTGATCCCCTGTGCCAGTCTTCGCCGTAGCAATATTACCAAACGCTCTGGCCGTGTTAT
ACTTCGTGTGTCAAGTTAAACTTTAGCTCTCCCGTCAGCTTGCAGCTTTATATGGCATAAATAAATGCTTACATATG
AGCCATTTCCACCGAACTGTGTCTCCAGTGTGCGTGAATAAACAACCTGACGGAGATGATGATGATGATGATGATAG
GTACACAAGGACTCACGCTTACTTCACGTGAGTGCTCGCTCGCGCTGTTAAGCGCGACTCGGAGTGCCCGGCCAGTG
TCGCATCCAGGGGTTACCTAGGCGTCATGTACCTGAGCTTCTCCGAGGGAACGAGGTGGCGCGATTCTACCTGCGC
CACTTTTGAAAATATTGCCAGGCGACAAAGACGGTTTTCACTCG

[0061] SSR23, 由 SEQ ID NO:6 所示的核苷酸序列组成:

[0062] ACCAGAGTCGGTATATCCACCTCCGCGCAAGGTCATGTGACCTTTCGAGAAAGTATACAAGTCATCGAC
GAGCCTAGCCCAGAGTCTGATACTGAAGAGGAAGAGCAGAACCTGACGGATACAGAGCCTAACACTGAGGAGGAGGA
CATAGAAGGCGAGGAGCCTACTCACAAACCAATTCTGGTGATGGAGGACAATATCGACGACGACGACGACGACGAAG
GGGAGGAGGAACGAAGCGACAGTGCCAACGTAAGTTAATCCTTTCACATCAGAATCTGGTATGTCCATGTTTTCC
CTGTCTACGACAATGCTAACCATTTGAGACAGACATTCCTTCGTTCCGGTCTTTGGGACTGGAGCTGTTCCGAGGAC
TCTCGTTTCAGCTGGCCCGTGCATGTCATGCTTCTGCAAGCCTGC

[0063] SSR32, 由 SEQ ID NO:7 所示的核苷酸序列组成:

[0064] GGAGAAGGTGTTGAATGTTCCGTTTCTGTGGCTTTCCTCAATCCAAGTTCGCGAGAGAGAATATTTCCGA
GAGGCAGTCGTCGTTCAAGGTGTCGATGAAGGTGGAAGGTAGTTGCATGACGCTGATGAAATGTGAGTCAACGCACA
GGAATTGAGTTGGGGACACATACCTCGACATCGTAGAATGAAGGTAGGTGGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
GGAGGTAGGAAATGATCATATGTGTGTGGCTTTTGTATGCAAAGTGGCGTGTACGATCTGTTATTGTTTCAGCTCGGC
AAATCAAAAGTGGAAACAAAACCGGTCTTACGGTCAATTCATTCTGAACAGCGGACTGAGCGCAATCTTCCCATTCC

CACATGACAACGAAAGAGAGCAATGTGTAGGGGTGGAAGGGTCCCCG

[0065] SSR45, 由 SEQ ID NO:8 所示的核苷酸序列组成:

[0066] CCCAACACCCGACATATACAATTAAGGGATGTCAAATATCTACTGCTACATATACAATATGAACAAAAT
CTCTACTAAGTAAATATAACACAAAAATACAAAGCGCTCCAAAAAATAAAAGCCCCATCAGGTATCACCCCTCCCCGCT
ACCCCTTCAACAACCCACTTCATCCTCTCCACCGCACCAAGATGCCACGGCATAACCACCACCACCACCCTCCGTC
CACCCCCATCCCCTTCAAACCCCCAACACTGCCAACCCAAAAATACGACCGCGTCACATCCCTAACCAACTCCTCA
TGCCCCCTCGCAGGATACACACACCCACAGACCGTATGACATGCACAAGATGCACATGCACCATGCTCACATTCCC
GCTCTCCGGCACCCGAATCAGTGTGAGCTCGCATGCG

[0067] SSR87, 由 SEQ ID NO:9 所示的核苷酸序列组成:

[0068] CTTTGTGAATTTTCACTACATATCGTACTTACTGATTTCGCACTGAATGGTTGATTCTTCCC GCCCTCC
TTTGAGTGTCTTTGACGGCTTCAGGATAGGAAATGAAGTTGTCACTTCGACACCGAAATCTGTGAAAAGTATCAA
TGAGCTAGCCCGGGCCGCTTGTCCATGTCGTTCTCTGTTTCTTACCATCACTTGTCTCTCTCTCTCTAATATCAT
TTGCTAGACATGAATGGTAAGCTTATAAGACGTCTACTTCTCCTTCCAACCTCCGATTCAAAGAGGAAGGTCTCGAGG
TCAATATCAACGACATACGTTAGTCTACACTTCTTATCGAATCCTTTCGCTGACATCTTCCAGCATTGTCAGATCA
GTCAGCATTACTGTACATGTGAAGAATGATACCGTTC

[0069] SSR95, 由 SEQ ID NO:10 所示的核苷酸序列组成:

[0070] TTTGTTGTTCTAAAGCTGAGCTTTGACTAGTTGGCGTTTCCGACAACCTTAGCGGTTGGCTTGGCTTTTG
GGGCTATTTTGGATTGGGTGTAGAAAATAACTTGTAACTCTTGTTTTACGAAGAATCGACTAAGTCAAATTTATCAC
CCCTCGCGGTGGGCTCCAAAATATGATGAGCAGTGCAAAAAGAACACCACCAAATCACACACACACACACTAACAA
GTAGGCGTGAAAATGCAAGTCCGCTTCGATAGCGGGTCTGCTTTTAAATTGTTTAGAGTTCGATGAACTGGTCTTTG
GGGTTTCCGGAAGGTATGGGGTTCGATTGCAACGGTTCAAAATGTATAACAAGTTCGAGGGGTAACAGGGATCTGA
TCTTTAGTTGAAAAGTAGAGGCCAACAAAGAGTCACAGGC

[0071] SSR107 由 SEQ ID NO:11 所示的核苷酸序列组成:

[0072] GCTCCTTTGTTGCGCGCTGGCAAGACGCGACGAGCTCTGATTCTACACGGACGTCTTCGGTTACCTTGG
CACTGGGAAGGACGATGGACATGGAATAGAGGTGTCCGAAATGCGAGCCATGTATGCGCTCTAGGTGCGTTGATCAC
CACTCTGCGCTCGTTTTTCTCATCCTTAGGCGATTTGCGCATAGGTGCATAGAGGAGAGAGAGACGCGAGTCATG
TTAGCGTTTCGATAGGTGTGTTTCAACGGCTCTGCGCTCTTTTTCTTTGCTCAGATAAGGTTCGATAGGTGCCAGA
GCGCCTGTCATTCCCCCTTCTCCATCACCTTCTACGAGCGCCAGACAGAGCTGTATAACCTGGCGGGATGCGCAAAC
TCGTGCAACGAACGACCCGTCGCGGGCGAATGCAT

[0073] SSR124, 由 SEQ ID NO:12 所示的核苷酸序列组成:

[0074] CATGATGAACAGAACAATGTACGCGGAACAGAAAAGCTCGTCATAAGGCCCAAAAATTGAGAGGGTGCA
TGGAGGTGGACCGGCCATTTGATTCAAATGACAGCTGTCCCGTCGACGTCATCCCCTATCCTCCACGAAAGTATAAA
GGTCAACACGAACGACTGAACTTTCCCCCATCCCTCATACCTCATCATGTCATACAACAACAACAACACTCTGAT
TCCTACGGCTCGAACGACAACTCGAACTCCTCCCGCAACGAGGATTCGTCCAACACCTACGGCGGTGGAGATCGCGA
GTCCTCCAACAACCTTTCGTGCTACGGCAATGATTCCTCCGCTCGTGCTACGACCACTTCTCGTACGGCGACAACG
ATCGTTCTTCTCCAACAACAACCTCTAACACCAACTCC

[0075] SSR133, 由 SEQ ID NO:13 所示的核苷酸序列组成:

[0076] GACGTTTCAGGAAATGAACGTCGAGTGATTCAGGACGCTACGAGACCAATGCTATACGGATATTTAATT
CTATCTAGTTTACTTACTATTCTTGCCCTTATACCAACCTTATACTAAATGATGATCTACGTTGTTGAAGTGCTTTAG

CCGTCCGGCCGATCGAATCCAGGCCTTCGCCTTGGTCTACGAACTAGCTCCTCTTCTCTCTCTCATGTCCGAG
TCAACAATCTCAACGACCTTTACAGAGTCGCCTCCATCATCGCCTAGTGGATGGATTGACTCGTCTCCCCATCATC
ACCTGGCGGAGAAGCCCCAGACATTAGCTTCGACCATCCCTATGCTGGCTCTCAGAAGCTCACACGTAAACCGAAAG
ACTACGACCGGGAAGCGCGTGGGTTTCAGGAAACCTCG

[0077] 上述 SSR 分子标记的引物序列分别为：

[0078] SSR2-F, 由 SEQ ID NO:14 所示的核苷酸序列组成：

[0079] GCACGCTCCT AAACCTATCG

[0080] SSR2-R, 由 SEQ ID NO:15 所示的核苷酸序列组成：

[0081] CGACTTGTCG AGGAAGATCC

[0082] SSR7-F, 由 SEQ ID NO:16 所示的核苷酸序列组成：

[0083] ACGCTAATCC GCTTGTTTCAT

[0084] SSR7-R, 由 SEQ ID NO:17 所示的核苷酸序列组成：

[0085] TCGCGTCACT CGTGTAAGTC

[0086] SSR15-F, 由 SEQ ID NO:18 所示的核苷酸序列组成：

[0087] GATGACGAGG ACAGTGACGA

[0088] SSR15-R, 由 SEQ ID NO:19 所示的核苷酸序列组成：

[0089] CCTCCTTCCT CCTCCATAGC

[0090] SSR21-F, 由 SEQ ID NO:20 所示的核苷酸序列组成：

[0091] GAAGCTGATC CTTGGCTTTG

[0092] SSR21-R, 由 SEQ ID NO:21 所示的核苷酸序列组成：

[0093] CTAGACACAC CGCCTCTTCC

[0094] SSR22-F, 由 SEQ ID NO:22 所示的核苷酸序列组成：

[0095] TCTTCGGATG CTTTGAATC

[0096] SSR22-R, 由 SEQ ID NO:23 所示的核苷酸序列组成：

[0097] TCGTTCTCTT TGCACACGTC

[0098] SSR23-F, 由 SEQ ID NO:24 所示的核苷酸序列组成：

[0099] AAGTCATCGA CGAGCCTAGC

[0100] SSR23-R, 由 SEQ ID NO:25 所示的核苷酸序列组成：

[0101] CGAACGAAGG GAATGTCTGT

[0102] SSR32-F, 由 SEQ ID NO:26 所示的核苷酸序列组成：

[0103] CGTCGTTCAA GGTGTCGATG

[0104] SSR32-R, 由 SEQ ID NO:27 所示的核苷酸序列组成：

[0105] GACCGTTGT TTGTTCCACT

[0106] SSR45-F, 由 SEQ ID NO:28 所示的核苷酸序列组成：

[0107] CCCAACACCG GACATATACA

[0108] SSR45-R, 由 SEQ ID NO:29 所示的核苷酸序列组成：

[0109] GTTGGTTAGG GATGTGACGC

[0110] SSR87-F, 由 SEQ ID NO:30 所示的核苷酸序列组成：

[0111] CGCTTGTCCTA TGTCGTTCTC

- [0112] SSR87-R, 由 SEQ ID NO:31 所示的核苷酸序列组成 :
- [0113] TGCTGACTGA TCTGACAATG C
- [0114] SSR95-F, 由 SEQ ID NO:32 所示的核苷酸序列组成 :
- [0115] ACAACTTAGC GGTTGGCTTG
- [0116] SSR95-R, 由 SEQ ID NO:33 所示的核苷酸序列组成 :
- [0117] CTATCGAAGC GGACTTGCAT
- [0118] SSR107-F, 由 SEQ ID NO:34 所示的核苷酸序列组成 :
- [0119] ACACGGACGT CTTCGGTTAC
- [0120] SSR107-R, 由 SEQ ID NO:35 所示的核苷酸序列组成 :
- [0121] AGAGCCGTTG AAACACACCT
- [0122] SSR124-F, 由 SEQ ID NO:36 所示的核苷酸序列组成 :
- [0123] AATTGAGAGG GTGCATGGAG
- [0124] SSR124-R, 由 SEQ ID NO:37 所示的核苷酸序列组成 :
- [0125] GTGTTGGACG AATCCTCGTT
- [0126] SSR133-F, 由 SEQ ID NO:38 所示的核苷酸序列组成 :
- [0127] TGAACGTCGA GTGATTCAGG
- [0128] SSR133-R, 由 SEQ ID NO:39 所示的核苷酸序列组成 :
- [0129] GGAGACGAGT CAATCCATCC
- [0130] 4. SSR 位点遗传多样性信息计算 :

[0131] 将获得的 SSR 数据运用 PopGene32 和 PIC_CALC 软件进行各位点的遗传多样性指标及多态性信息含量 (Polymorphism information content, PIC) 计算, 结果如表 2, 13 个 SSR 位点在 55 个金针菇样品中的等位基因数 (N_a) 为 2-8 个, 平均 4.2 个, 香浓多样性指数 (I) 平均值为 0.821, 观测杂合度 (H_o) 平均值为 0.401, 期望杂合度 (H_e) 平均值为 0.455, 多态性信息含量 (PIC) 平均值为 0.426, 结果表明 13 个 SSR 位点在金针菇样本中具有较高的多态性。用软件 NTsys 2.10e 构建样品间的 UPGMA 树, 结果如图 1, 13 个 SSR 位点可将 55 个金针菇菌株区分开。

[0132] 表 2 13 个微卫星位点的遗传多样性信息

[0133]

Locus	Na	I	Ho	He	PIC
SSR7	4	1.088	0.745	0.610	0.564
SSR2	4	1.05	0.564	0.591	0.544
SSR15	2	0.632	0.400	0.440	0.359
SSR21	7	1.461	0.436	0.691	0.713
SSR22	8	1.357	0.455	0.681	0.649
SSR23	3	0.599	0.418	0.359	0.364
SSR32	8	1.294	0.236	0.592	0.567
SSR45	3	0.835	0.455	0.491	0.432
SSR87	3	0.752	0.400	0.481	0.399
SSR124	4	0.815	0.436	0.507	0.437
SSR133	6	0.856	0.200	0.409	0.434
SSR95	3	0.752	0.600	0.481	0.415
SSR107	6	0.629	0.309	0.277	0.374
Mean	4.15	0.821	0.401	0.455	0.426

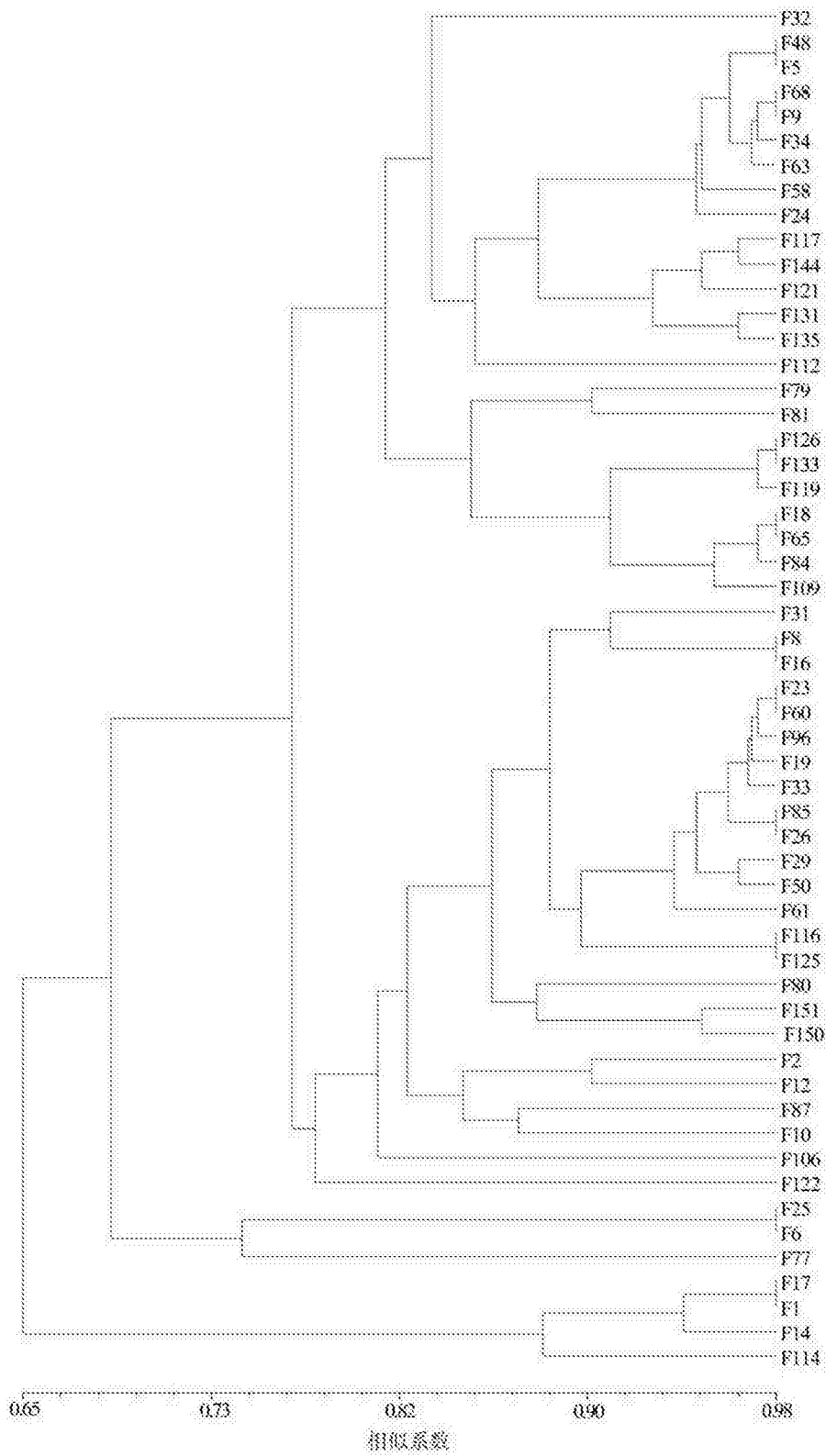


图 1