

利用 InDel 标记分析中国香菇菌株的遗传多样性与群体结构

沈秀芬^{1, 2*} 章炉军^{2*} 张美彦² 张丹² 于海龙^{1, 2*} 李玉^{1, 2*}

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 上海市农业科学院食用菌研究所 国家食用菌工程技术研究中心 上海 201403

摘要: 通过对 5 个香菇菌株重测序, 以香菇 L808-1 菌株的全基因组序列为参考基因组, 分析了这些菌株中插入/缺失 (InDel) 标记位点在香菇基因组 10 条染色体上的分布, 并筛选了插入/缺失碱基数 ≥ 15 的位点, 合成了 449 对 InDel 标记引物。经过 PCR 和电泳检测, 其中 237 对引物条带清晰。最终筛选出 107 个 $PIC \geq 0.3$ 的标记作为核心 InDel 标记对来自国内的 44 份香菇菌株进行遗传多样性分析。聚类分析显示栽培菌株和野生菌株各自聚为一支, 所选香菇菌株间存在明显的群体分层。群体结构分析显示香菇种质资源可分为 4 个亚群, 主成分分析显示香菇菌株之间的位置及距离与聚类分析和群体结构分析结果相符。香菇 InDel 分子标记的开发与应用, 为香菇核心种质的构建和种质资源育种引用提供了基础。

关键词: 香菇, 重测序, InDel 标记, 遗传多样性, 群体结构

[引用本文] 沈秀芬, 章炉军, 张美彦, 张丹, 于海龙, 李玉, 2021. 利用 InDel 标记分析中国香菇菌株的遗传多样性与群体结构. 菌物学报, 40(9): 2266-2281

Shen XF, Zhang LJ, Zhang MY, Zhang D, Yu HL, Li Y, 2021. Genetic diversity and population structure of *Lentinula edodes* analyzed by InDel markers. Mycosystema, 40(9): 2266-2281

基金项目: 上海市科技兴农项目 (2019-02-08-00-08-F01114); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-20); 上海市农业科学院卓越团队[2017(A-02)]

Supported by Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (2019-02-08-00-08-F01114), China Agriculture Research System (CARS-20), and SAAS Program for Excellent Research Team [2017(A-02)].

* Corresponding authors. E-mail: yuli966@126.com, yuhailong_01@126.com

* Co-first authors.

ORCID: SHEN XF (0000-0001-9501-5181), YU Hai-Long (0000-0001-7604-5297)

Received: 2021-01-25, accepted: 2021-02-28

Genetic diversity and population structure of *Lentinula edodes* analyzed by InDel markers

SHEN Xiu-Fen^{1, 2} ZHANG Lu-Jun² ZHANG Mei-Yan² ZHANG Dan² YU Hai-Long^{1, 2}
LI Yu^{1, 2}

①Engineering Research Centre of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China

②Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai 201403, China

Abstract: Based on resequencing five strains of *Lentinula edodes* and mapping the whole genome sequence of monokaryon strain L808-1, the insertion/deletion (InDel) markers on 10 chromosomes of *L. edodes* genome were analyzed. Loci with more than 15 InDel bases were selected, and 449 pairs of InDel primers were synthesized. PCR and electrophoresis results revealed that 237 pairs among them showed clear bands, and 107 pairs (PIC $\geq$ 3) were screened out as core InDel markers, which were later applied to analyze the genetic diversity of 44 *L. edodes* strains. Cluster analysis grouped the cultivars and wild strains into individual branches respectively, indicating the obvious population stratification among them. Population structure analysis categorized the germplasm resources of *L. edodes* into four subgroups. Principal component analysis showed that the position and distance between strains were consistent with the results of cluster analysis and population structure analysis. The InDel markers developed and applied in this paper provide a basis for the construction of *L. edodes* core germplasm and effective breeding of germplasms.

Key words: *Lentinula edodes*, re-sequencing, InDel markers, genetic diversity, population structure

香菇 *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, 隶属于担子菌门 Basidiomycota, 蘑菇纲 Agaricomycetes, 蘑菇目 Agaricales, 类脐菇科 Omphalotaceae (李玉等 2015)。香菇不仅味道鲜美, 且具有很高的营养价值, 富含 B 类营养物质和矿物质元素 (龚文兵 2014)。香菇中含有大量麦角甾醇, 经紫外线照射可转化为脂溶性维生素——麦角钙化甾醇, 能够促进人体对钙的吸收 (郑世杰等 2019); 此外, 香菇多糖作为一种有效药用成分, 具有很强的免疫调节

和抗肿瘤活性 (张淇淇等 2020)。据中国食用菌协会 2019 年度食用菌统计调查结果, 香菇是我国产量最大的品种, 总产量 1 115.94 万吨, 比 2018 年增长 6.97% (中国食用菌协会 2020)。随着产业规模的不断增大, 对品种的广适性和多样性提出了更高的要求。为加快香菇育种和遗传改良进程, 将分子标记辅助育种与传统育种相结合, 选育出优质高产的香菇新品种尤为重要, 而分子标记的开发是分子辅助育种的基础。

基因差异可导致不同香菇菌株表型的不同,分子标记技术以不同基因组 DNA 等位序列之间的差异为基础,发展成为图位克隆和分子辅助育种的关键技术。前期香菇分子标记研究主要基于随机标记如 AFLP、RAPD、ISSR、SRAP 和 SCAR (王子迎和王叔通 2005, 2006; 卓英等 2006; Fu *et al.* 2010; Liu *et al.* 2012b), 对不同地区的香菇品种进行遗传学研究。但这些标记存在重复性不好、开发成本高和非共显性等缺点。基因组测序技术加深了我们对物种的理解,也为我们开发共显性标记提供便利。董慧等(2017)利用 24 对 SSR 引物对我国 51 份主栽香菇菌株进行遗传多样性分析,在相似系数为 0.69 时将香菇群体分为 4 个类群,说明我国香菇遗传背景较近。

InDel (insertion/deletion) 分子标记是基于高通量测序技术的应用,其多态性突变数目比 SNP 标记较低,密度远高于 SSR 标记(Liu *et al.* 2012a)。相对于 SNP 标记,InDel 标记可排除单碱基的无义突变能有效地鉴定出样品间的亲缘关系(Santos *et al.* 2015),InDel 分子标记设计与检测更简单,开发成本较低(Varshney *et al.* 2009),适用于食用菌全基因组测序分子标记的开发(Gao *et al.* 2012)。目前,香菇 InDel 标记的遗传多样性研究较少,Xiang *et al.* (2016)对我国分布于横断山脉、云南高原、西北部、中部 4 个地区的 88 株野生香菇种质资源进行群体结构和遗传多样性分析;Li *et al.* (2017)使用 249 对 InDel 标记与 48 对 SSR 标记对我国香菇 89 个栽培菌株进行遗传多样性分析。香菇遗传多样性研究,为理清香菇品种间的亲缘关系,解决“同种异名、异种同名”的产业问题,指导香菇高效育种研究奠定了基础。本文以课题组测序完成的香菇 L808-1 菌株的全基因组序

列为参考基因组,根据 44 株菌株重测序结果开发 InDel 标记,对我国主要香菇栽培菌株进行了遗传多样性分析及群体结构分析,明确了 44 株香菇菌株之间的遗传差异,为香菇育种亲本选择提供指导,从而促进分子标记辅助选育香菇新品种。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株: 本试验选择具有代表性的香菇菌株,共包括:15 个国审菌株、26 个地方主栽培菌株和 3 个野生菌株,由国家食用菌工程技术研究中心提供,各菌株来源见表 1。

1.1.2 菌丝体制备: 将活化后的供试菌株转接到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA,含玻璃纸)平板中央,25℃恒温避光培养 10d,收集菌丝体于-50℃保藏备用。

1.2 DNA 制备和 InDel 引物开发

1.2.1 基因组 DNA 提取: 采用改良的 CTAB 法(Murray *et al.* 1980)提取 44 株香菇菌株菌丝体的基因组 DNA 并检测基因组 DNA 质量, $c(\text{DNA})=1\ 600\text{--}3\ 000\text{ng}/\mu\text{L}$, $OD_{260}/OD_{280}=1.81\text{--}1.98$ 。将 DNA 原液稀释为 $c(\text{DNA})=20\text{--}30\text{ng}/\mu\text{L}$,混匀后分装放入-20℃冰箱备用。

1.2.2 InDel 标记引物开发: 对 5 个双核体香菇菌株(L241-4、L212、L135、4705、华 134)DNA 制备 400bp 文库,使用 Illumina Hiseq2500 平台进行双端 150bp 高通量测序,测序质控后的原始数据 fq 文件在 linux 系统中使用 bwa (version 0.7.10) 软件(Li & Durbin 2009)的 bwa mem 命令比对到参考基因组序列 808-1. (GenBank accession No. JABFYJ000000000) fasta 上,得到各菌株比对上的 bam 文件,bam 文件经过去重复、排序后使用 GATK-Haplotype Caller (version 4.0.3.0) 软件(McKenna *et al.* 2010)进行 SNP calling,并将所有菌株的 SNP、

表 1 菌株信息列表

Table 1 List of strain information

序号	菌株	菌株类型	农艺性状	菌株来源
No.	Strains	Strain type	Agronomic traits	Origin
1	CX20	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、短菌龄菌株 MLFT and SVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
2	香九 Xiangjiu	栽培菌株（野生驯化）， 国审品种 Cultivated strain (domestication of wild strain), national authorized variety		广东省微生物研究所 Guangdong Institute of Microbiology
3	L7402	栽培菌株 Cultivated strain		松阳县食药菌研究所 Songyang Institute of Edible and Medicinal Fungi
4	森源 8404 Senyuan 8404	栽培菌株，国审品种 Cultivated strain, national authorized variety	中低温、长菌龄菌株 MLFT and LVGR	湖北省宜昌森源食用菌有限责任公司 Hubei Yichang Senyuan Edible Fungi Co. Ltd.
5	华香 5 号 Huaxiang 5	栽培菌株，国审品种 Cultivated strain, national authorized variety	中低温、短菌龄菌株 MLFT and SVGR	华中农业大学 Huazhong Agricultural University
6	Z3242	栽培菌株 Cultivated strain		国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
7	广香 Guangxiang	栽培菌株（野生驯化） Cultivated strain (domestication of wild strain)		广东省微生物研究所 Guangdong Institute of Microbiology
8	4688	野生菌株 Wild strain		采自四川省凉山州西昌市冕宁县 Collected from Mianning County, Xichang City, Liangshan Prefecture, Sichuan Province
9	L9319	栽培菌株，国审品种 Cultivated strain, national authorized variety		浙江省丽水市大山菇业研究开发有限公司 Zhejiang Lishui Dashan Mushroom Industry Research and Development Co. Ltd.
10	闽丰 1 号 Minfeng 1	栽培菌株，国审品种 Cultivated strain, national authorized variety		福建省三明真菌研究所 Fujian Sanming Institute of Fungi
11	森源 1 号 Senyuan 1	栽培菌株，国审品种 Cultivated strain, national authorized variety		湖北省宜昌森源食用菌有限责任公司 Hubei Yichang Senyuan Edible Fungi Co. Ltd.
12	申香 18 号 Shenxiang 18	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、长菌龄菌株 MLFT and LVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center

待续

续表 1

13	香如 Xiangru	栽培菌株 Cultivated strain		国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
14	申香 15 号 Shenxiang 15	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、短菌龄菌株 MLFT and SVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
15	CV105	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、短菌龄菌株 MLFT and SVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
16	L241	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、长菌龄菌株 MLFT and LVGR	浙江省庆元县食用菌科学技术研究中心 Edible Fungi Science and Technology Research Center of Qingyuan County, Zhejiang Province
17	香杂 26 Xiangza 26	栽培菌株, 国审品种 Cultivated strain, national authorized variety	高温、短菌龄菌株 HFT and SVGR	广东省微生物研究所 Guangdong Institute of Microbiology
18	L9608	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、长菌龄菌株 MLFT and LVGR	河南西峡县食用菌科研中心 Edible Fungi Research Center, Xixia County, Henan Province
19	Z3244	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、长菌龄菌株 MLFT and LVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
20	申香 16 号 Shenxiang 16	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、长菌龄菌株 MLFT and LVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
21	华香 8 号 Huaxiang 8	栽培菌株, 国审品种 Cultivated strain, national authorized variety	高温菌株 HFT	华中农业大学 Huazhong Agricultural University
22	N7	栽培菌株 Cultivated strain		国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
23	RBL1	栽培菌株, 国审品种 Cultivated strain, national authorized variety		国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
24	L135	栽培菌株 Cultivated strain	低温、长菌龄菌株 LFT and LVGR	福建省三明真菌研究所 Fujian Sanming Institute of Fungi
25	沪香 F2 Huxiang F2	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、短菌龄菌株 MLFT and SVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center

待续

续表 1

26	L241-4	栽培菌株, 国审品种 Cultivated strain, national authorized variety	中低温、长菌龄菌株 MLFT and LVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
27	L26	栽培菌株 Cultivated strain	高温、短菌龄菌株 HFT and SVGR	福建省三明真菌研究所 Fujian Sanming Institute of Fungi
28	菌兴 8 号 Junxing 8	栽培菌株, 国审品种 Cultivated strain, national authorized variety	高温、短菌龄菌株 HFT and SVGR	浙江省丽水市食用菌研究开发中心, 浙江省林业科学研究院 Edible Fungi Research and Development Center of Lishui City, Zhejiang Province
29	CV501	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、长菌龄菌株 MLFT and LVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
30	苏香 Suxiang	栽培菌株 Cultivated strain	高温、短菌龄菌株 HFT and SVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
31	L952	栽培菌株, 国审品种 Cultivated strain, national authorized variety		华中农业大学 Huazhong Agricultural University
32	Z3239	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、短菌龄菌株 MLFT and SVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
33	Z3243	栽培菌株 Cultivated strain	短菌龄菌株 SVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
34	HK3161	栽培菌株 Cultivated strain		国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
35	L212	栽培菌株 Cultivated strain	中低温、短菌龄菌株 MLFT and SVGR	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
36	L868	栽培菌株 Cultivated strain	高温菌株 HFT	国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
37	TW1151	栽培菌株 Cultivated strain		国家食用菌工程技术研究中心 National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
38	L9015	栽培菌株, 国审品种 Cultivated strain, national authorized variety	中低温、长菌龄菌株 MLFT and LVGR	浙江省庆元县食用菌科学技术研究中心 Edible Fungi Science and Technology Research Center of Qingyuan County, Zhejiang Province

待续

续表 1

39	申香 12 号	栽培菌株, 国审品种	高温、短菌龄菌株	国家食用菌工程技术研究中心
	Shenxiang 12	Cultivated strain, national authorized variety	HFT and SVGR	National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
40	J868	栽培菌株	高温菌株	国家食用菌工程技术研究中心
		Cultivated strain	HFT	National Edible Fungi Engineering Technology Research Center
41	森源 10 号	栽培菌株, 国审品种	长菌龄菌株	湖北省宜昌森源食用菌有限责任公司
	Senyuan 10	Cultivated strain, national authorized variety	LVGR	Hubei Yichang Senyuan Edible Fungi Co. Ltd.
42	华 134	野生菌株		采自湖北省
	Hua 134	Wild strain		From Hubei Province
43	4705	野生菌株		采自四川省凉山州西昌市冕宁县
		Wild strain		Collected from Mianning County, Xichang City, Liangshan Prefecture, Sichuan Province
44	931	栽培菌株	高温、短菌龄菌株	国家食用菌工程技术研究中心
		Cultivated strain	HFT and SVGR	National Edible Fungi Engineering Technology Research Center

Note: HFT: High fruiting temperature; MLFT: Medium low fruiting temperature; LFT: Low fruiting temperature; LVGR: Long vegetative growth rate; SVGR: Short vegetative growth rate.

InDel 差异汇总至一个 vcf(variant call format) 软件 (Danecek *et al.* 2011) 中。vcf 文件可使用 Mircosoft Office Excel 2010 打开, 筛选出 InDel 碱基数≥15bp 的位点。使用 IGV (integrative genomics viewer) (version 2.3.91) 软件 (Thorvaldsdóttir *et al.* 2012) 对基因组及部分菌株比对的 bam 文件进行位点查看, 尽可能地降低假阳性结果, 最终选择了 499 个位点进行引物设计。引物通过 Premier Primer 5.0 软件于 InDel 位点两翼各 200bp 长度内进行设计, 获得的引物序列由生工生物工程(上海) 股份有限公司合成。

1.2.3 引物筛选及群体扩增: 将合成的 449 对引物, 以亲缘关系较远的 5 个菌株 (4705、华 162、4617、4619、9608) DNA 为模板进行 PCR 扩增, 筛选出条带清晰, 多态性丰富的引物。PCR 扩增体系: 2×Es Premix *Taq*TM 10μL, InDel 标记正向引物、反向引物 (10μmol/L) 各

1μL, 模板 DNA (20–30ng/μL) 2μL, 补 ddH₂O 至 20μL; PCR 扩增条件: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 55–60℃ 45s, 72℃ 30s, 35 个循环; 72℃ 7min; 10℃ 保存。取 PCR 扩增产物 7μL 进行琼脂糖凝胶电泳 (2.5%琼脂糖凝胶, 电压 90V, 电泳 5h), 用凝胶成像系统拍照并分析结果。

1.3 数据分析

1.3.1 群体聚类分析和多态性分析: 对 InDel 标记的分子检测结果进行统计分析, 分子量较大条带记为 A, 分子量小片段记为 B, 两条带型记为 H, 无条带记为 N, 进行基因型分型统计。基于 InDel 标记对香菇菌株的基因分型结果, 采用 TASSEL 5.0 软件 (陆海燕等 2019) 对相似系数进行分析, 运用 UPGMA 法进行聚类分析, 构建聚类分析图。根据基因分型结果, 以及标记在香菇基因组染色体上的分布等信息, 利用 Power Marker 3.2 (Liu & Muse 2005) 计算基因型数 (genotype No.)、等位基因频

率(major allele frequency)、基因多样性(gene diversity)、表观杂合度(heterozygosity)、多态信息含量(polymorphism information content)。

1.3.2 群体结构和主成分分析: 使用 Structure 2.3.4 对香菇资源进行群体结构分析, 计算出最佳亚群体数。详细分析步骤如下: (1) 对亚群数目 K 的取值范围为 2–15, 模拟参数迭代(length of burnin period) 计算次数设置为 10 000 次, 蒙特卡罗迭代(number of MCMC Reps after burnin) 计算次数设置为 10 000 次, 每个 K 值重复运算 10 次。(2) 将所得 K 值结果提交到在线工具 Structure Harvester ([http://taylor0.biology.ucla.edu/structure Harvester/](http://taylor0.biology.ucla.edu/structure%20Harvester/)) 通过后验概率值的变化速率(ΔK) 确定群体的最优亚群数。(3) 利用 Clusters (Jakobsson & Rosenberg 2007) 软件进行重复抽样分析。使用 distruct 1.1 (Rosenberg 2004) 软件对结构进行绘图。利用 VCFtools 软件 ([https://vcftools.Github.io/index.html](https://vcftools.github.io/index.html)) 计算群体分化指数(F_{st}) (Danecek *et al.* 2011)。使用 TASSEL 5.0 软件, 利用 InDel 标记对 44 个香菇菌株进行主成分分析, 并绘制三维 PCA 结构图。

2 结果与分析

2.1 香菇基因组范围内 InDel 分布

在香菇 L808-1 全基因组中 10 个染色体(chr) 上出现 InDel 的数量共有 142 315 个, 平均每 M 碱基序列长度的插入/缺失位点数量为 3 个。其中, InDel 序列等于 1bp 数量的有 46 416 个, 序列为 2–5bp 数量有 65 873 个, 序列为 6–9bp 数量有 16 378 个, 序列为 10–14bp 数量有 8 369 个, 筛选出 InDel 序列 ≥ 15 bp 的位点有 5 281 个位点, 其中缺失 ≥ 15 bp 位点有 4 310 个, 插入 ≥ 15 bp 位点有 971 个。不同数量 InDel 位点及 107 个 InDel 分子标记在染色体上分布见图 1。

2.2 InDel 多态性分析

以 44 份不同香菇材料的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 验证 449 对引物的有效性。经检测发现, 237 对引物均能扩增出与预测大小一致的目标条带。以引物 Lefp_id23 与 Lefp_id27 在部分香菇材料中的扩增结果为例, 可扩增出 4 种带型(图 2)。为了进一步筛选出具有代表性的核心分子标记, 我们对鉴定出的 237 对 InDel 引物进行过滤。以引物能够扩增出特异性强且主带清晰和 $PIC \geq 0.30$ 为标准(周玲等 2016), 最终筛选出 107 对核心 InDel 分子标记, 分布在香菇基因组的 10 个染色体上。其 PIC 变化范围为 0.30–0.38, 平均值为 0.34, 表明筛选出的 InDel 分子标记引物特异性强, 稳定性高。

2.3 聚类分析

遗传相似系数可以很好地表示菌株之间的遗传变异水平, 通过 TASSEL 5.0 计算得到各菌株间的遗传相似系数, 结果显示 44 株香菇菌株的变化范围为 0.50–1.00。从聚类分析(图 3) 可以看出, 遗传相似性为 0.59 时, 将供试菌株分为 3 大类群, 类群 A 和类群 B 为国内主栽品种; 类群 C 为野生菌株。遗传相似系数在 0.64 水平上时, 供试菌株分为 5 个类群, A 类群被分为两个亚群, A1 亚群主要为短菌龄中低温品种, A2 亚群主要为高温品种; B1 和 B2 群体为长菌龄中低温品种; C 群体为野生菌株。

2.4 基因多样性分析

根据 Power Marker V3.25 计算得到各菌株间基因多样性分析结果, 我国香菇栽培菌株中存在两株重复基因型, 说明育种存在近亲杂交或自交的情况。等位基因频率在 0.529–0.728 之间, 平均等位基因频率为 0.691。基因多样性在 0.393–0.498 之间, 平均值为 0.418。 PIC 值在 0.315–0.374 之间, 平均值为 0.330, 表明 InDel 分子标记多态性较高(表 2)。

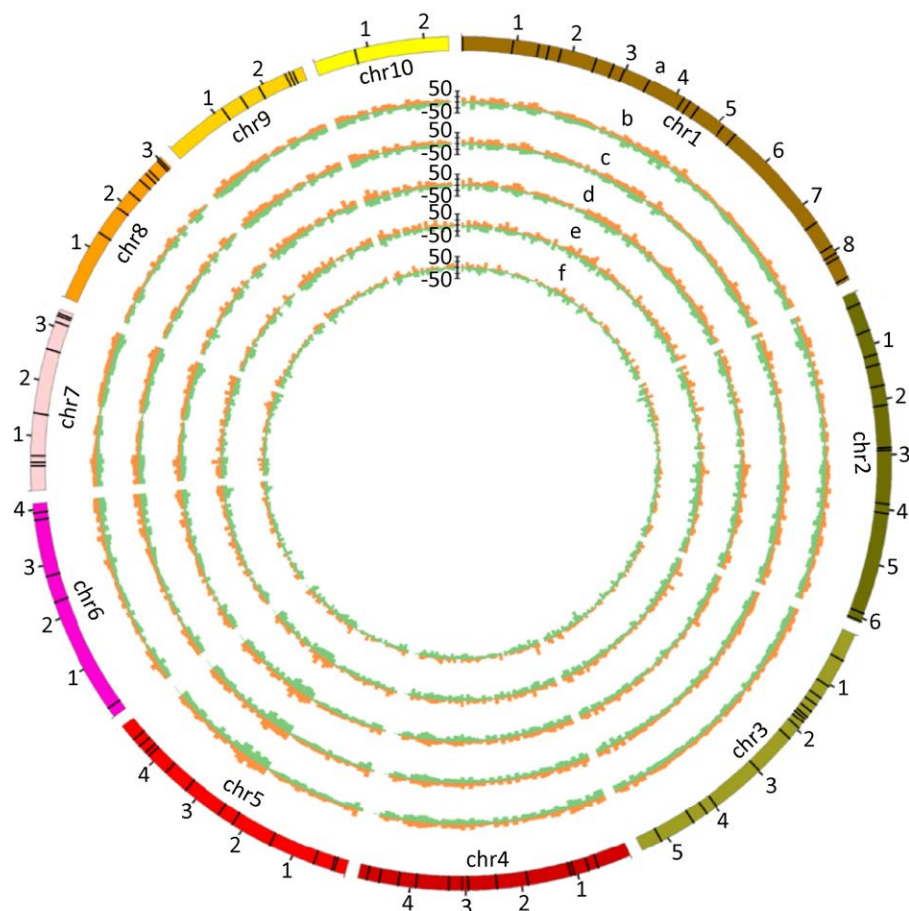


图 1 十个染色体上 InDel 位点分布 a: 染色体长度及 107 个核心 InDel 标记位置; b: InDel 等于 1 的数量; c: InDel 等于 2–5 的数量; d: InDel 等于 6–9 的数量; e: InDel 等于 10–14 的数量; f: InDel 大于等于 15 的数量

Fig. 1 Distribution of InDel sites on 10 chromosome. a: Chromosome length and 107 core InDel marker sites; b: InDel equals the number of 1; c: InDel is equal to the number of 2–5; d: InDel is equal to the number of 6–9; e: InDel is equal to the number of 10–14; f: InDel is greater than or equal to the number of 15.

2.5 香菇群体结构分析

通过 STRUCTURE 软件利用 107 对高质量 InDel 标记对 44 个香菇菌株进行群体结构分析。分析变化速率 ΔK , 在 ΔK 的范围内数值显示 $K=4$ 时明显的最大值 ($\Delta K=63.63$) (图 4A), 较高的 K 值没有出现二次峰。因此 44 个菌株可分为 4 个遗传类群 (图 4B): 亚群 I (9 个菌株) 与聚类图谱 A2 相一致; 亚群 II (18 个菌株) 与聚类图谱 A1 相一致; 亚群 III (10 个菌株) 将聚类图谱 C 和 B2 聚为一类, B2 群体基因中含有野生菌株基因渗透, 如香九和

广香为国内野生菌株驯化而来; 亚群 IV (7 个菌株) 与聚类图谱相 B1 一致, 这与 UPGMA 聚类结果一致。

利用 VCFtools 软件计算香菇 4 个亚群之间的群体分化指数 (表 3), 4 个亚群间群体分化指数在 0.0002–0.0067 之间, 平均遗传分化指数为 0.0027。群体分化指数均小于 0.05, 表明 4 个亚群之间均处于低等分化, 亲缘关系较近。

2.6 香菇群体主成分分析

通过 TASSEL 5.0 软件利用 107 对高质量 InDel 标记对 44 个香菇菌株进行绘图 (图 5)。

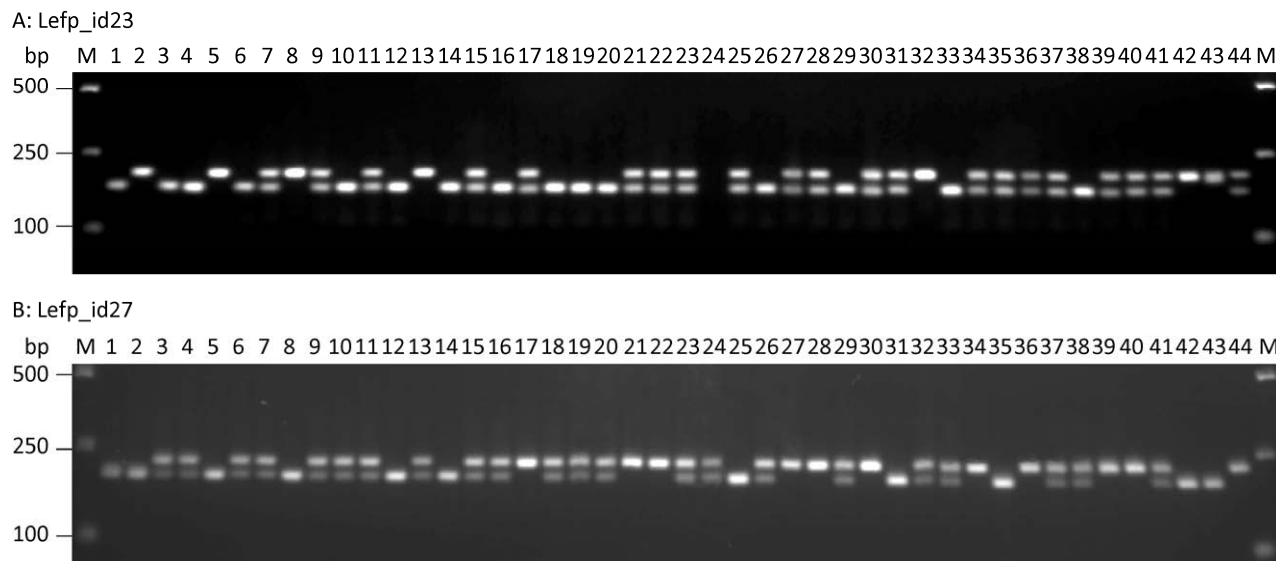


图 2 两个 InDel 多态性标记检测结果 1–44: 菌株信息见表 1

Fig. 2 Detection results of 2 InDel polymorphism markers. 1–44: The strains are shown in Table 1.

根据菌株在三维图形中的位置和互相间距离可区分为 5 类, 分别对应分支 A1 短菌龄中低温品种, 分支 A2 高温品种, 分支 B1 和 B2 长菌龄中低温品种, 分支 C 中有 3 株野生菌株和一株由野生菌株驯化而来的栽培菌株 (香九), 其分类与遗传距离和进化树分类结果一致。Group A1 与 Group A2 间位置临近, Group B1 与 Group B2 间位置也比较临近; 在 Group A1 中, 沪 F2 与 L212 和 N7 与 HK3161 菌株的位置重叠在一起, 与遗传距离和进化树聚类结果一致。

3 讨论

3.1 基因组范围内 InDel 变异位点的分析

InDel 分子标记具有稳定性好、共显性的特点, 被认为是比较可靠的分子标记。近年来基因组测序、重测序工作的开展为 InDel 分子标记的开发提供了便利 (Ajawatanawong & Baldauf 2013)。刘伟等 (2019) 对梯形羊肚菌全基因组 SNP/InDel 分析, 获得了 18 438 个 SNP/InDel 位点, 其中 InDel 多态性位点 1 334 个, 以 2–10bp 的插入缺失为主。施肖堃等 (2019)

对 18 个双孢蘑菇菌株进行重测序并比对到双孢蘑菇 H97 参考基因组上, 共检测到 53 840 个 InDel 位点, 平均每个个体获得 924 个 SV 变异。沈颖越等 (2020) 通过对来自国内外的 28 份金针菇菌株资源的重测序共计检测到 SNP 位点 1 241 583 个, InDel 位点 623 670 个。本文在香菇基因组内检测到 142 315 个 InDel 位点, 平均每 M 碱基序列长度的位点变异序列变异数量为 3 个, 相对于羊肚菌 (子囊菌) 和双孢蘑菇 (次级同宗配合担子菌) InDel 位点数量较多, 而香菇和金针菇 InDel 数量较多, 表明 InDel 分子标记在四极性异宗结合的担子菌中分辨率较高, 适合开发 InDel 分子标记对香菇遗传多样性进行研究。同时也表明, InDel 分子标记在香菇菌株鉴别中更为适用, 可筛选出一批特异性好的 InDel 分子标记, 为香菇品种鉴定和杂交育种等提供技术支撑。

3.2 食用菌遗传多样性分析

食用菌种质资源遗传多样性研究主要分为: 生理生化标记、子实体表型标记和 DNA 分子标记, 但前两种标记需消耗大量人力和物力, 易受到环境等客观因素及检测者的主

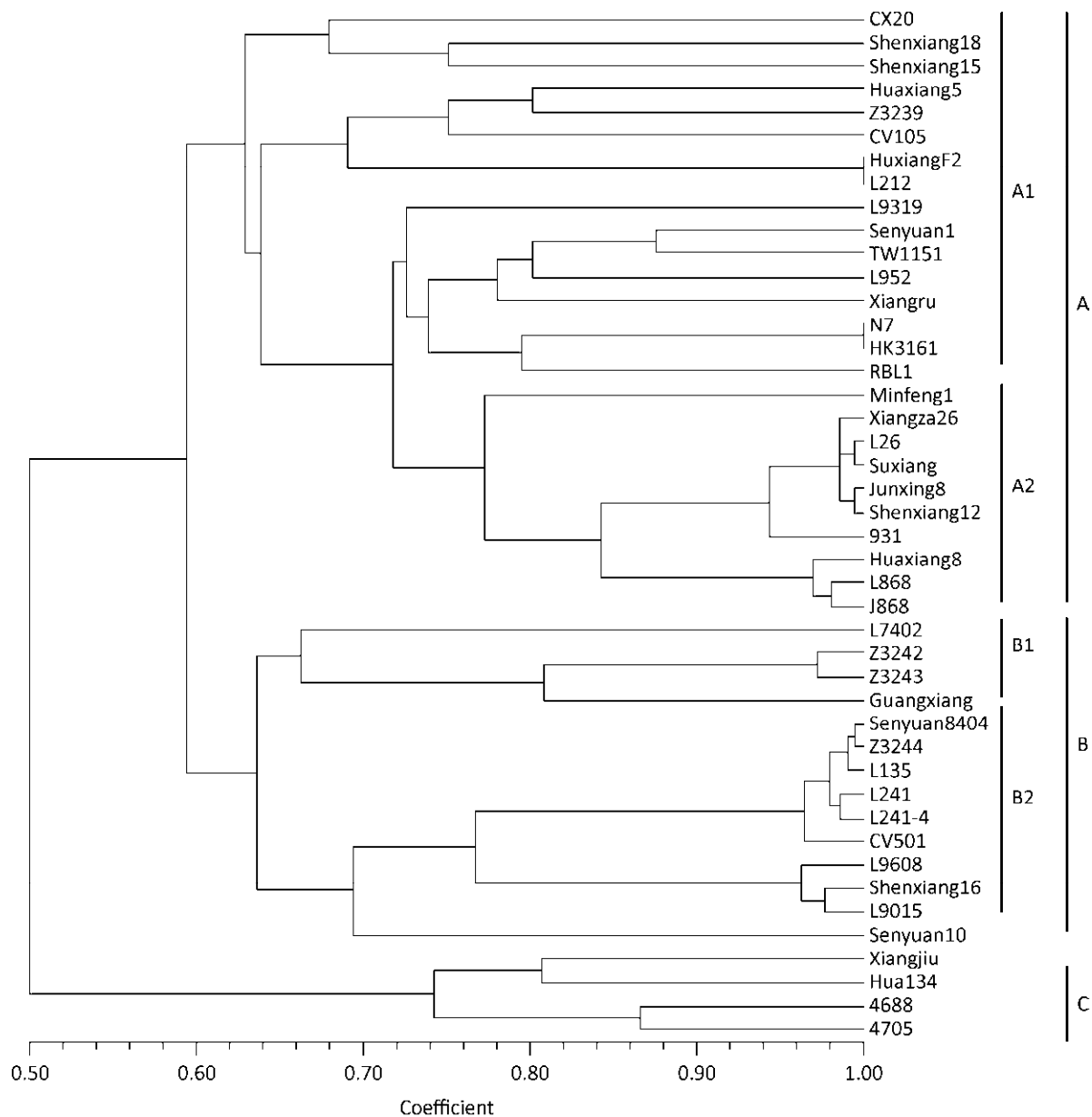


图 3 44 个香菇菌株聚类图谱 类群 A 和类群 B 为国内主栽品种，类群 C 为野生菌株；A1 亚群主要为短菌龄中低温品种，A2 亚群主要为高温菌株，B1 和 B2 群体为长菌龄中低温菌株

Fig. 3 Cluster map of 44 *Lentinula edodes* strains. Groups A and B were the main cultivated strains in China, and group C was the wild strains. Subgroup A1 was mainly medium low fruiting temperature with short vegetative growth rate strains, subgroup A2 was mainly high temperature strains, and population B1 and B2 were medium low fruiting temperature with long vegetative growth rate strains.

观因素影响（张树庭和林芳灿 1997；李黎 2011）。DNA 分子标记则不受外界环境和生长阶段限制。本文基于全基因组水平的 InDel 变异位点的分析，对 $\geq 15\text{bp}$ 长度的变异位点

进行 InDel 标记开发，在香菇群体内进行了扩增分析和遗传图谱构建。将香菇划分为 3 大类群：类群 A 和类群 B 为国内主栽品种；类群 C 为野生菌株和经野生菌株驯化选育而来

表 2 香菇类群基因多样性分析

Table 2 Genetic diversity analysis of *Lentinula edodes*

Populations	基因型数 Genotype No.	等位基因数 Allele No.	等位基因频率 Major allele frequency	基因多样性 Gene diversity	表观杂合度 Heterozygosity	PIC 值 Polymorphism information content
A	3	2	0.7275	0.3934	0.525521208	0.3154
B	3	2	0.6692	0.4422	0.6148	0.3444
C	3	2	0.5292	0.4978	0.7687	0.3739
Means	3	2	0.6910	0.4184	0.5760	0.3300

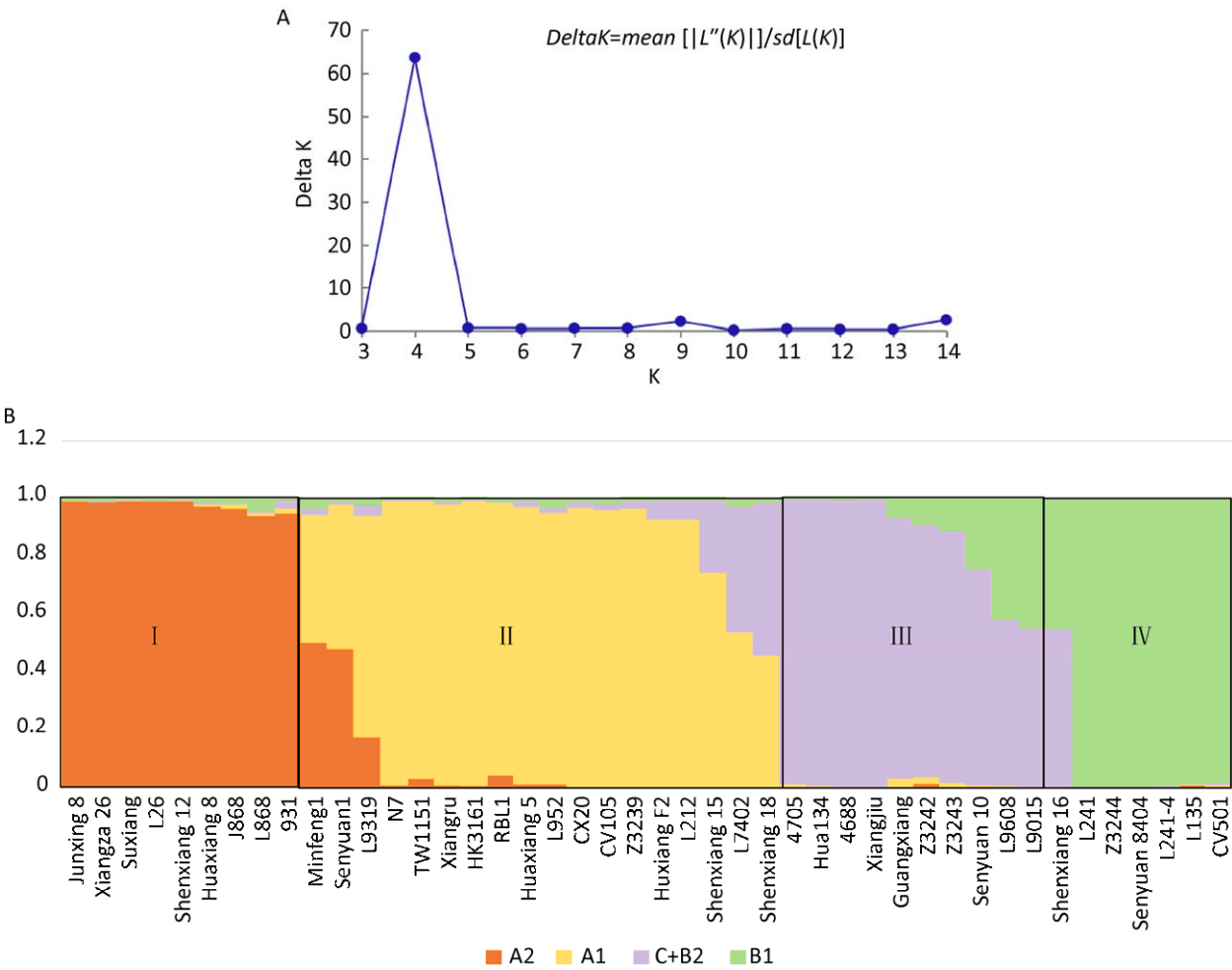


图 4 香菇种质资源群体结构分析 A: ΔK 相对于 K 的分布; B: K=4 时 Q 值分布. 亚群 I 主要为高温菌株, 亚群 II 主要为短菌龄中低温菌株, 亚群 III 将聚类图谱 C 和 B2 聚为一类, B2 群体基因中含有野生菌株基因渗透; 亚群 IV 与聚类图谱 B1 一致

Fig. 4 Bayesian clustering (STRUCTURE, K=4) of *Lentinula edodes* using InDel data. A: ΔK between successive K from 3–14; B: Q-value bar plot in K=4. Subgroup I was mainly high fruiting temperature strains. Subgroup II was mainly short vegetative growth rate with medium low fruiting temperature strains. Subgroup III clustered cluster map C and B2 into one group, and the genes of B2 contained wild strains. Subgroup IV was consistent with cluster map B1.

表 3 群体分化指数 (Fst) 的统计

Table 3 Statistics of population differentiation index (Fst)

亚群 Subgroup	I	II	III	IV
I				
II	0.0009			
III	0.0006	0.0002		
IV	0.0067	0.0042	0.0034	

的栽培品种，结果与董慧等（2017）的研究结果一致，说明 InDel 分子标记准确性较高。InDel 分子标记已开始应用在食用菌研究中，Gong *et al.*（2014）利用 SRAP、TRAP、InDel 等技术，以 146 株单核孢子分离株为基础，构建了香菇连锁图谱标记和配对型位点。Im *et al.*（2016）利用 28 对 InDel 标记引物、226 对 SSR 标记引物，构建了白灵菇的遗传连锁图谱。与普通作物水稻、玉米、棉花（周玲

等 2016；季高翔等 2018；Whankaew *et al.* 2020）等遗传研究相比还有较大差距，在香菇遗传进化和分子标记辅助育种中尚未被报道。应运用多种遗传标记对现有种质资源的遗传多样性进行综合分析，特别是对特殊种质进行研究，为核心种质库的构建和资源高效利用提供指导。

3.3 群体结构与主成分分析

利用 STRUCTURE 软件对香菇群体的群体结构分析表明，当 K=4 时， ΔK 最大，由此将 44 份香菇种质划分为 4 个亚群：4 个亚群分别对应聚类分析结果 A1 群体、A2 群体、B1 群体、B2 和 C 群体。Xiang *et al.*（2016）对我国 88 个野生香菇菌株进行遗传多样性分析，遗传分化指数为 0.252，表现出较高的遗传分化。在本研究 4 个亚群中，群体分化指数为 0.0027，表明该香菇群体存在偏弱的遗传分化，即各亚群间亲缘关系相对较近，基

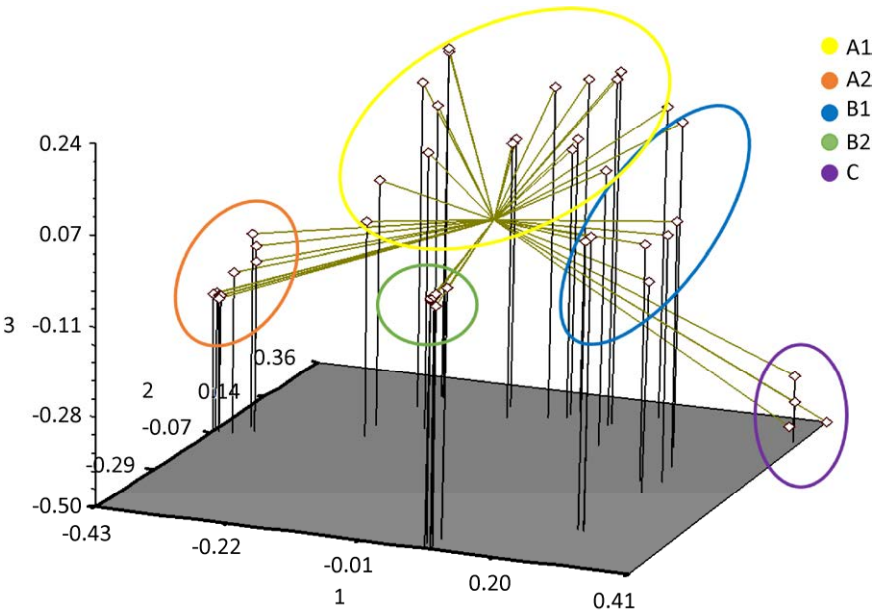


图 5 香菇主成分分析 A1 主要为短菌龄中低温菌株，A2 主要为高温菌株，B1 和 B2 为长菌龄中低温菌株，C 中有 3 株野生菌株和一株由野生菌株驯化而来的栽培菌株

Fig. 5 Principal component analysis of the strains of *Lentinula edodes* using InDel data. A1 was mainly short vegetative growth rate with medium low fruiting temperature strains, A2 was mainly high fruiting temperature strains. B1 and B2 were medium low fruiting temperature with long vegetative growth rate strains, and C contains 3 wild strains and one cultivated strain domesticated from the wild strain.

因范围小,不利于新品种选育。可挑选优质野生香菇品种与现有的栽培菌株进行杂交,从而丰富已有的香菇种质资源。两种分析软件得到的结果既有一致性,也有差异,这与香菇遗传背景复杂性有关。STRUCTURE 分析将 44 个香菇菌株分为 4 个遗传类群(A1、A2、B1、B2+C),并将亲缘关系较近的野生菌株 C 类群和有野生菌株基因渗透的 B2 类群聚在一起;利用 TASSEL 5.0 软件进行 PCA 分析,根据菌株在三维图形中的位置和互相间距离可区分为 5 类,该结果与聚类分析在遗传相似性为 0.64 时分为 5 个小亚群(A1、A2、B1、B2 和 C)一致,栽培菌株和野生菌株区分较为明显。两种分析软件将个体在群体之间的位置更清晰地表现出来,亲缘关系更为直观,它们之间相互补充及印证,说明本研究结果的可信度和正确性。后续工作可以对现有种质资源的整体遗传结构进行探索,并在此基础上利用分子辅助聚合育种,通过野生×栽培的杂交方式筛选和鉴定后代群体的高产、优质的遗传变异,提高育种效率。

[REFERENCES]

- Ajawanawong P, Baldauf SL, 2013. Evolution of protein indels in plants, animals and fungi. BMC Evolutionary Biology, 13(1): 140-155
- China Edible Fungi Association, 2020. Letter of China Edible Fungi Association on the issuance of the results of the statistical survey on the output and output value of edible fungi in 2019. <https://cefa.org.cn/web/index.html> (in Chinese)
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, Handsaker RE, Lunter G, Marth GT, Sherry ST, McVean G, Durbin R, 2011. The variant call format and VCFtools. Bioinformatics, 27(15): 2156-2158
- Dong H, Zhang LJ, Zhang MY, Jiang N, Yu HL, Song CY, Shang XD, Tan Q, 2017. Genetic diversity and fingerprint profiles of Chinese major *Lentinula edodes* cultivars based on SSR markers. Microbiology China, 44(6): 1427-1436 (in Chinese)
- Fu LZ, Zhang HY, Wu XQ, Li HB, Wei HL, Wu QQ, Wang LA, 2010. Evaluation of genetic diversity in *Lentinula edodes* strains using RAPD, ISSR and SRAP markers. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(4): 709-716
- Gao Q, Yue G, Li W, Wang J, Xu J, Yin Y, 2012. Recent progress using high-throughput sequencing technologies in plant molecular breeding. Journal of Integrative Plant Biology, 54(4): 215-227
- Gong WB, 2014. Quantitative trait loci mapping of important agronomic trait in *Lentinula edodes*. PhD Dissertation, Huazhong Agricultural University, Wuhan. 1-141 (in Chinese)
- Gong WB, Liu W, Lu YY, Bian YB, Zhou Y, Kwan HS, Cheung MK, Yang X, 2014. Constructing a new integrated genetic linkage map and mapping quantitative trait loci for vegetative mycelium growth rate in *Lentinula edodes*. Fungal Biology, 118(3): 295-308
- Im CH, Park YH, Hammel KE, Park BY, Kwon SW, Ryu HJ, Ryu JS, 2016. Construction of a genetic linkage map and analysis of quantitative trait loci associated with the agronomically important traits of *Pleurotus eryngii*. Fungal Genetics and Biology, 92: 50-64
- Jakobsson M, Rosenberg NA, 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics, 23(14): 1801-1806
- Ji GX, He SP, Pan ZE, Gong WF, Jia YH, Wang LR, Wang PP, Geng XL, Du XM, 2018. Localization of a dwarfing mutation in upland cotton using InDel markers based on genome re-sequencing data. Cotton Science, 30(6): 448-454 (in Chinese)
- Li C, Gong WB, Zhang L, Yang ZQ, Nong WY, Bian YB, Kwan HS, Cheung MK, Xiao Y, 2017. Association

- mapping reveals genetic loci associated with important agronomic traits in *Lentinula edodes*. Shiitake Mushroom, 8(2): 237
- Li H, Durbin R, 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics, 25(14): 1754-1760
- Li L, 2011. Studies on genetic diversity of *Auricularia auricula-judae* cultivated germplasm resources in China. PhD Dissertation, Huazhong Agricultural University, Wuhan. 1-133 (in Chinese)
- Li Y, Li TH, Yang ZL, Bau T, Dai YC, 2015. Atlas of Chinese macrofungal resources. Central China Farmer Press, Zhengzhou. 1-1351 (in Chinese)
- Liu B, Wang Y, Zhai W, Deng J, Wang H, Cui Y, Cheng F, Wang X, Wu J, 2012a. Development of InDel markers for *Brassica rapa* based on whole-genome re-sequencing. Theoretical and Applied Genetics, 126(1): 231-239
- Liu JY, Ying ZH, Liu F, Liu XR, Xie BG, 2012b. Evaluation of the use of scar markers for screening genetic diversity of *Lentinula edodes* strains. Current Microbiology, 64(4): 317-325
- Liu K, Muse SV, 2005. Power marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics, 21(9): 2128-2129
- Liu W, Zhang QQ, Shu F, Cai YL, Ma XL, Bian YB, 2019. Genome-wide SNP/Indel analysis and the construction of genetic linkage maps based on InDel markers of *Morchella importuna*. Mycosystema, 38(12): 2195-2204 (in Chinese)
- Lu HY, Chen L, Wang XS, Zhao H, Shen Q, 2019. Development and application of cotton InDel markers based on high throughput sequencing. Cotton Science, 31(4): 297-306 (in Chinese)
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA, 2010. The genome analysis toolkit: a mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Research, 20(9): 1297-1303
- Murray MG, Thompson CL, Wendel JF, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8(19): 4321-4326
- Varshney RK, Nayak SN, May GD, Jackson SA, 2009. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. Trends in Biotechnology, 27(9): 522-530
- Wang ZY, Wang ST, 2005. Analysis of genetic diversity and heterosis of *Lentinula edodes* strains in Anhui Province of China using RAPD. Chinese Agricultural Science Bulletin, 21(9): 31-33 (in Chinese)
- Wang ZY, Wang ST, 2006. Analysis of genetic diversity and heterosis of *Lentinula edodes* strains in Anhui Province of China using ISSR. Mycosystema, 25(2): 211-216 (in Chinese)
- Whankaew S, Kaewmanee S, Ruttajorn K, Phongdara A, 2020. InDel marker analysis of putative stress-related genes reveals genetic diversity and differentiation of rice landraces in peninsular Thailand. Physiology and Molecular Biology of Plants, 26(6): 1237-1247
- Rosenberg NA, 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. Molecular Ecology Resources, 4(1): 137-138
- Santos C, Fondevila M, Ballard D, 2015. Forensic ancestry analysis with two capillary electrophoresis ancestry informative marker (AIM) panels: results of a collaborative EDNAP exercise. Forensic Science International: Genetics, 19(11): 56-67
- Shen YY, Jin QL, Cai WM, Fan LJ, Feng WL, Song TT, 2020. Analyses of population diversity and structure of *Flammulina filiformis* strains based on whole genome resequencing data. Mycosystema, 39(6): 1016-1028 (in Chinese)
- Shi XK, Cai ZX, Guo ZJ, Lu YP, Chen MY, Liao JH, 2019. A preliminary report on resequencing 18 representative strains of *Agaricus bisporus*. Fujian Agricultural Journal, 34(10): 1167-1172 (in Chinese)
- Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP, 2012. Integrative Genomics Viewer (Igv): high-

- performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14(2): 178-192
- Xiang XJ, Li C, Li L, Bian YB, Hoi SK, Nong WY, Cheung MK, Xiao Y, 2016. Genetic diversity and population structure of Chinese *Lentinula edodes* revealed by InDel and SSR markers. *Mycological Progress*, 15(4): 37
- Zhang QQ, Zhou L, Zhu JH, Huang KF, 2020. The medicinal value of *Lentinus edodes* and the development prospect of its products. *Yangtze River Vegetables*, 496(2): 38-43 (in Chinese)
- Zhang ST, Lin FC, 1997. Inheritance and breeding of mushroom. China Agricultural Press, Beijing. 1-288 (in Chinese)
- Zheng SJ, Zhang R, Yang SD, Bau T, Li Y, Bao HY, 2019. Content determination and transmission mechanism in human body of *Lentinula edodes* ergocalciferol. *Mycosystema*, 38(5): 739-752 (in Chinese)
- Zhou L, Liang SQ, Lin F, Lv YD, 2016. Biallelic InDel loci detection and molecular marker development in maize. *Jiangsu Agricultural Journal*, 32(6): 1223-1231 (in Chinese)
- Zhuo Y, Tan Q, Chen MJ, Cao H, Jia YN, Pan YJ, 2006. AFLP analysis of genetic diversity in main cultivated strains of *Lentinula edodes*. *Mycosystema*, 25(2): 203-210 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 董慧, 章炉军, 张美彦, 姜宁, 于海龙, 宋春艳, 尚晓冬, 谭琦, 2017. 中国香菇主栽品种遗传多样性的 SSR 分析及指纹图谱构建. *微生物学通报*, 44(6): 1427-1436
- 龚文兵, 2014. 香菇重要农艺性状的 QTL 定位. 华中农业大学博士论文, 武汉. 1-141
- 季高翔, 何守朴, 潘兆娥, 龚文芳, 贾银华, 王立如, 王朋朋, 耿晓丽, 杜雄明, 2018. 基于重测序开发的 InDel 标记定位陆地棉矮化突变体. *棉花学报*, 30(6): 448-454
- 李黎, 2011. 中国木耳栽培种质资源的遗传多样性研究. 华中农业大学博士论文, 武汉. 1-133
- 刘伟, 张倩倩, 舒芳, 蔡英丽, 马晓龙, 边银丙, 2019. 梯棱羊肚菌全基因组 SNP/Indel 分析及基于 Indel 标记的遗传连锁图谱构建. *菌物学报*, 38(12): 2195-2204
- 李玉, 李泰辉, 杨祝良, 图力古尔, 戴玉成, 2015. 中国大型菌物资源图鉴. 郑州: 中原农民出版社. 1-1351
- 陆海燕, 程璐, 王显生, 赵涵, 沈奇, 2019. 基于高通量测序的棉花 InDel 标记开发及其应用. *棉花学报*, 31(4): 297-306
- 施肖堃, 蔡志欣, 郭仲杰, 卢园萍, 陈美元, 廖剑华, 2019. 18 个双孢蘑菇核心种质的重测序初步分析. *福建农业学报*, 34(10): 1167-1172
- 沈颖越, 金群力, 蔡为明, 范丽军, 冯伟林, 宋婷婷, 2020. 基于重测序信息的金针菇菌株资源遗传多样性及群体结构分析. *菌物学报*, 39(6): 1016-1028
- 王子迎, 王书通, 2005. 安徽野生香菇遗传多样性及杂种优势的 RAPD 分析. *中国农学通报*, 21(9): 31-33
- 王子迎, 王书通, 2006. 安徽野生香菇遗传多样性及杂种优势的 ISSR 分析. *菌物学报*, 25(2): 211-216
- 张淇淇, 周良, 朱俊豪, 黄凯丰, 2020. 香菇的药用价值及其产品开发前景. *长江蔬菜*, 496(2): 38-43
- 张树庭, 林芳灿, 1997. 蕈菌遗传与育种. 北京: 中国农业出版社. 1-288
- 郑世杰, 张蕊, 杨树德, 图力古尔, 李玉, 包海鹰, 2019. 香菇中麦角钙化甾醇含量的测定及其在人体内的传输机制. *菌物学报*, 38(5): 739-752
- 中国食用菌协会, 2020. 中国食用菌协会关于印发全国食用菌 2019 年度产量、产值统计调查结果的函. <https://cefa.org.cn/web/index.html>
- 周玲, 梁帅强, 林峰, 吕远大, 2016. 玉米二态性 InDel 位点的鉴定和分子标记开发. *江苏农业学报*, 32: 1223-1231
- 卓英, 谭琦, 陈明杰, 曹晖, 贾亚妮, 潘迎捷, 2006. 香菇主要栽培菌株遗传多样性的 AFLP 分析. *菌物学报*, 25(2): 203-210

(本文责编: 王敏)