

基于 SSR 标记构建平菇栽培品种核心样本方法的探讨

李 慧^{1,2}, 陈 强², 黄晨阳², 谢宝贵¹, 张金霞^{2,*}

(¹ 福建农林大学菌物研究中心, 福州 350002; ² 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业部农业微生物资源收集与保藏重点实验室, 北京 100081)

摘 要: 为了探讨基于 DNA 分子标记构建平菇栽培品种核心样本的方法, 基于 48 个平菇栽培菌株的 11 个 SSR 位点, 根据遗传距离进行 UPGMA 聚类, 采用位点优先取样策略, 结合表型性状, 在不同 SSR 等位基因保留比例 (100%、95%、90%、85%、80%) 水平上构建核心样本, 进而确定取样量。采用稀有等位基因保留比例以及对 Nei's 基因多样性和 Shannon's 信息指数进行 *t* 检验, 评价核心样本的代表性, 并且根据表型保留比例以及极差、均值和标准差的符合率对核心样本的代表性作进一步确认。结果表明: 采用位点优先取样策略, 在等位基因保留比例为 95% 的水平上构建的核心样本能够以最小的样本量最大限度地代表原种质的遗传多样性。

关键词: 平菇; 核心样本; 取样方法; 分子标记; 表型; 遗传多样性

中图分类号: S 646.1⁺4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 10-2023-10

A Method for Establishing Core Collection of *Pleurotus ostreatus* Cultivated in China Based on SSR Markers

LI Hui^{1,2}, CHEN Qiang², HUANG Chen-yang², XIE Bao-gui¹, and ZHANG Jin-xia^{2,*}

(¹ Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ² Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Microbial Resources, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: The method for establishing core collection of *Pleurotus ostreatus* cultivated in China based on the molecular markers data was proposed. For 11 SSR makers of 48 *P. ostreatus* cultivars, an allele preferred sampling strategy was used to establish *P. ostreatus* core collection using UPGMA cluster method according to the genetic distances and the phenotypic traits. The size of each core collection was determined when the ratio of SSR alleles retained was maintained at 100%, 95%, 90%, 85% and 80% respectively. The ratio of SSR rare alleles retained and *t*-test of Nei's gene diversity and Shannon's information index were used to evaluate representativeness of the core collections. This was followed by analyses of the phenotypic representativeness of the core collections, including the coincidence rates of range, mean, and standard deviation between the core collections. Our analyses identified that the allele preferred sampling strategy could be used to establish the most representative core collection with the least

收稿日期: 2012-06-01; 修回日期: 2012-09-28

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-24)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhangjx1210@yahoo.com.cn)

samples when the ratio of SSR alleles retained was maintained at 95%.

Key words: *Pleurotus ostreatus*; core collection; sampling method; molecular makers; phenotype; genetic diversity

平菇 (*Pleurotus ostreatus*) 是中国产量第一的食用菌 (关景奎, 2011), 其栽培种质丰富多样 (张金霞和谢宝贵, 2006)。当前, 平菇优良种质的发掘与利用是平菇育种工作的关键, 但是由于中国食用菌知识产权保护意识的缺乏, 使其种质资源较为混乱, 加上长期人工选择和品种单一化, 使育种材料的选择空间非常有限 (付立忠 等, 2005)。所以从中国栽培平菇种质资源中筛选出较少量的核心样本, 具有较大的遗传差异和特殊的遗传特性, 能够更好地有利于平菇种质资源利用和种质创新。近年来, 基于分子标记构建核心样本的研究已经在玉米、水稻、莲花等种质中展开 (Ebana et al., 2008; 姚启伦 等, 2009; Kai et al., 2010), 并且关于核心样本的构建方法也有很多报道 (王丽侠 等, 2004; 张春雨 等, 2009)。但是, 关于食用菌种质资源核心样本研究的报道甚少。本研究中基于中国 48 个平菇栽培品种的 11 对 SSR 分子标记数据, 参照位点优先取样策略, 提出了针对小样本容量的原种质在构建核心样本过程中取样量的确定方法, 以期和平菇栽培品种核心样本的构建提供方法依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来自国家食用菌标准菌株库 (China Center for Mushroom Spawn Standards and Control, CCMSSC), 为全国各地的主栽品种, 经本实验室多年栽培试验和 ISSR 等 DNA 分子指纹分析, 确认为性状不同和具遗传特异性的 48 个菌株 (表 1)。

1.2 出菇试验

于 2011 年 10 月将所有供试菌株接种于北京市门头沟区丁家滩村试验基地。每个菌株设 3 个小区, 每个小区 25 袋, 使用传统配方, 墙式码放出菇, 常规管理, 每丛菇八分熟时取中间 3 个子实体, 3 个小区至少取 80 个子实体, 进行性状观测。

1.3 表型性状的观测

参考《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南总则》(GB/T 19557.1-2004) 以及日本食用菌种协会 (1978) 的糙皮侧耳种苗特性分类调查报告书规定的测定项目和方法, 对 24 个表型性状, 包括 15 个非数值型性状 (表 2) 和 9 个数值型性状 (表 8) 进行观测。其中表 2 中的子实体颜色参考 Moquet 和 Ramos (1997) 的方法, 采用分光测色仪 (CM-2600d) 进行测量。

1.4 SSR 标记分析

将供试菌株接种于 PDA 平皿上, 25 °C 避光隔膜培养 9 d, 收集菌丝, 使用 Plant Genomic DNA Kit 提取总 DNA。SSR 引物序列来源 Ma 等 (2009), 由上海生工生物技术有限公司合成, 共筛选出 11 对引物详见表 3。PCR 总反应体系为 20 μL , 含 Ex Taq (5 U \cdot μL^{-1}) 0.1 μL , dNTPs (各 2.5 mmol \cdot L^{-1}) 1.6 μL , 10 \times Ex Taq buffer (Mg^{2+} plus) 2 μL , 正反向引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , ddH₂O 13.3 μL 。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 36 个循环; 最后 72 °C 补平 7 min, 4 °C 保存。扩增产物取 1 μL 于 DNA1000 芯片上, 根据使用说明在 Agilent 2100 生物分析仪上分析。

表 1 供试菌株及核心样本构建结果
Table 1 Tested strains and core collection for *Pleurotus ostreatus*

编号 No.	CCMSSC 编号 CCMSSC No.	品种名 Name	来源 Source	特征 Character		核心 Core
				出菇温度 / °C Fruiting temperature	子实体颜色 Color of fruiting body	
1	00304	冈崎姬菇 Okazaki Jigu	河北 Hebei	5 ~ 30	灰色 Gray	
2	00328	超低温平菇 Chaodiwen Pinggu	河北 Hebei	4 ~ 18	暗黄褐色 Dark yellow-brown	√
3	00336	糙皮侧耳 3 Caopi Ceer 3	湖北 Hubei	5 ~ 18	暗灰褐色 Dark gray-brown	
4	00358	特白 1 号 Tebai 1	江苏 Jiangsu	5 ~ 18	白色 White	
5	00359	宁杂 1 号 Ningza 1	江苏 Jiangsu	5 ~ 30	浅黄褐色 Light yellow-brown	
6	00374	亚光 1 号 Yaguang 1	北京 Beijing	5 ~ 28	暗黄褐色 Dark yellow-brown	√
7	00375	法国无孢 3 号 Faguo Wubao 3	湖北 Hubei	5 ~ 28	暗黄褐色 Dark yellow-brown	
8	00386	鲁南 1 号 Lunan 1	山东 Shandong	5 ~ 28	暗黄褐色 Dark yellow-brown	
9	00388	晋平 Jinping	山西 Shanxi	5 ~ 28	灰色 Gray	
10	00389	89	河北 Hebei	5 ~ 28	暗黄褐色 Dark yellow-brown	√
11	00391	ACCC 50601	湖南 Hunan	5 ~ 28	暗灰褐色 Dark gray-brown	√
12	00397	丰收 1 号 Fengshou 1	上海 Shanghai	5 ~ 28	深灰色 Dark gray	
13	00398	ACCC 50712	香港 Hong Kong	5 ~ 28	灰色 Gray	√
14	00403	P928	福建 Fujian	10 ~ 30	灰色 Gray	√
15	00406	99	辽宁 Liaoning	5 ~ 28	暗灰褐色 Dark gray-brown	√
16	00419	加拿大 7 号 Canada 7	陕西 Shaanxi	5 ~ 30	灰色 Gray	√
17	00435	P82	四川 Sichuan	5 ~ 28	暗黄褐色 Dark yellow-brown	
18	00436	京平 Jingping	四川 Sichuan	5 ~ 18	灰色 Gray	√
19	00457	ACCC 50234	江苏 Jiangsu	5 ~ 18	灰色 Gray	√
20	00503	中蔬 10 Zhongshu 10	北京 Beijing	15 ~ 30	乳白色 Cream white	√
21	00509	F 姬菇 F jigu	上海 Shanghai	15 ~ 30	乳白色 Cream white	
22	00578	平 001 Ping 001	上海 Shanghai	5 ~ 18	深灰色 Dark gray	√
23	00585	51	湖北 Hubei	15 ~ 30	乳白色 Cream white	√
24	00588	江都 206 Jiangdu 206	江苏 Jiangsu	5 ~ 30	暗黄褐色 Dark yellow-brown	
25	00599	925	湖北 Hubei	10 ~ 30	浅黄褐色 Light yellow-brown	√
26	00613	姬菇 1 号 Jigu 1	湖北 Hubei	5 ~ 28	深灰色 Dark gray	
27	00622	苏研 7 号 Suyan 7	湖北 Hubei	10 ~ 28	灰色 Gray	
28	03845	双抗黑平 Shuangkang Heiping	江苏 Jiangsu	5 ~ 28	深灰色 Dark gray	
29	03846	雪美 F2 Xuemei F2	江苏 Jiangsu	5 ~ 28	白色 White	√
30	03847	农平 1 号 Nongping 1	山东 Shandong	5 ~ 28	暗黄褐色 Dark yellow-brown	
31	03848	青平 1 号 Qingping 1	山东 Shandong	5 ~ 18	暗黄褐色 Dark yellow-brown	
32	03849	平 117 Ping 117	山东 Shandong	5 ~ 28	暗灰褐色 Dark gray-brown	√
33	03850	平 2004 Ping 2004	山东 Shandong	5 ~ 28	暗灰褐色 Dark gray-brown	√
34	03765	鲁植 1 号 Luzhi 1	山东 Shandong	5 ~ 18	暗黄褐色 Dark yellow-brown	
35	03851	2061	山东 Shandong	5 ~ 28	暗黄褐色 Dark yellow-brown	√
36	03763	豫平 1 号 Yuping 1	河南 Henan	5 ~ 18	深灰色 Dark Gray	√
37	03764	豫平 5 号 Yuping 5	河南 Henan	5 ~ 18	灰色 Gray	
38	03852	春山 Chunshan	山东 Shandong	5 ~ 28	暗灰褐色 Dark gray-brown	√
39	03853	珞珈 1 号 Luojia 1	福建 Fujian	5 ~ 18	暗黄褐色 Dark yellow-brown	
40	03760	中蔬 98 Zhongshu 98	福建 Fujian	5 ~ 30	乳白色 Cream white	√
41	03854	永发黑平 Yongfa Heiping	江苏 Jiangsu	5 ~ 18	暗黄褐色 Dark yellow-brown	√
42	03855	富达白平 Fuda Baiping	江苏 Jiangsu	5 ~ 28	灰色 Gray	
43	03762	F803	江苏 Jiangsu	10 ~ 30	乳白色 Cream white	√
44	03856	华平 97-2 Huaping 97-2	湖北 Hubei	5 ~ 30	乳白色 Cream white	
45	03857	长江 999 Changjiang 999	湖北 Hubei	5 ~ 18	白色 White	√
46	03759	三峡 1 号 Sanxia 1	四川 Sichuan	10 ~ 30	乳白色 Cream white	
47	03858	金凤 2-1 Jinfeng 2-1	四川 Sichuan	5 ~ 18	深灰色 Dark gray	√
48	03859	P42	江苏 Jiangsu	5 ~ 18	白色 White	

注：√ 表示构建出的核心样本。

Note: √ indicated the core collection selected from the primary population.

表 2 平菇 15 个非数值型性状及赋值
Table 2 Value assignment of 15 nonnumeric traits for *Pleurotus ostreatus*

性状 Traits	分级赋值 Value assignment
气生菌丝发达程度 Aerial hypha development	3: 稀 Sparse; 5: 普通 Medium; 7: 密 Dense
耐高温能力 Thermotolerance	1: 低 Low; 2: 中等 Medium; 3: 强 High
子实体发生型 Type of fruiting	1: 丛生 Clustering; 2: 散生 Scattered; 3: 叠生 Overlapping; 9: 其它 Others
子实体初期颜色 Color of primordium	1: 白色 White; 2: 乳白色 Cream white; 3: 浅黄褐色 Light yellow-brown; 4: 灰色 Gray; 5: 暗黄褐色 Dark yellow-brown; 6: 暗灰褐色 Dark gray-brown; 7: 深灰色 Dark gray
子实体采收期颜色 Color of cap for harvest	1: 白色 White; 2: 乳白色 Cream white; 3: 浅黄褐色 Light yellow-brown; 4: 灰色 Gray; 5: 暗黄褐色 Dark yellow-brown; 6: 暗灰褐色 Dark gray-brown; 7: 深灰色 Dark gray
菌盖截面形态 Shape of cap in longitudinal section	1: 凹形 Concave; 2: 漏斗形 Funnel-shaped; 3: 山形 Convex; 4: 平形 Flat
菌盖长宽比 Ratio of cap height/diameter	3: 1.0 ~ 1.2; 5: > 1.3
菌盖质地 Texture of cap	3: 疏松 Soft; 5: 普通 Medium; 7: 紧密 Hard
菌褶网纹 Network of decurrent gills	1: 有 Present; 9: 无 Absent
菌褶颜色 Color of gill	1: 白色 White; 2: 乳白色 Cream white; 3: 浅灰色 Light gray
菌柄着生方式 Attachment of stipe for cap	1: 近中生 Center; 2: 偏生 Eccentric; 3: 侧生 Adnate; 9: 其它 Others
菌柄形态 Shape of stipe	1: 细长 Slender; 2: 细短 Short thin; 3: 粗长 Long thick; 4: 粗短 Short thick; 5: 中粗 Medium thick; 9: 其它 Others
菌柄颜色 Color of stipe	1: 白色 White; 2: 乳白色 Cream white; 3: 浅灰色 Light gray
菌柄着生毛 Attachment of villus for stipe	1: 有 Present; 9: 无 Absent
菌柄质地 Texture of stipe	3: 疏松 Soft; 5: 普通 Medium; 7: 紧密 Hard

表 3 11 对 SSR 引物序列
Table 3 The SSR primer sequence for *Pleurotus ostreatus*

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	正向 Forward	反向 Reverse
S26	CTGGAGAATCGTAGCCCC		ACAAGCGCTCGGAATACA
S29	CATAGGGACGACAGCGAG		ACTGAGCCTTCAGCACCA
S37	CGCGAGACAATTAAACGC		ACAGTTCCTGGAGCCCAT
S38	TGTCTATGGGTTACGGCG		TGCAAAGCAAATCGGAAC
S41	TGGTAGCAGGTTGTTGGG		CCGCTAAGCCACTGTTTG
S43	TGCGTTTGCTCGGTTAAT		CGCTACTACGTCGATCCG
S44	TGATTGGTTGAATGGGC		GCACGATGAGGATGCAGT
S48	TATGGAACGGTGCGAAGT		GCCGTCAAAGGGAATC
S49	AGTGCATATGCCCGACAC		CGTCGTAGATGCAGGCTC
S51	GTCGTAGCCAGCCATGAG		AGGGTATCTCGGATGCAT
S56	AATCAACGGTGAGGACAG		GTGGCTTAGCATACTTCTT

1.5 表型和 SSR 分子数据处理

首先对 15 个非数值型性状按照标准赋值, 然后再行数据分析; 9 个数值型性状采用原始数据进行极差、均值、标准差等分析。根据 DNA1000 芯片检测结果, 统计 48 个样本的基因型, 并根据目的条带的有无转成 1, 0 数据。计算每个位点的等位基因数 N_A 、等位基因频率 P_i 、等位基因频率小于 5% 的稀有等位基因数 N_r (张春雨 等, 2009)、Nei's 基因多样性 H_e 以及 Shannon's 信息指数 I 。以上参数采用 PopGene1.32 进行分析。根据遗传距离使用 UPGMA 聚类法, 采用 NTSYSpc-2.10e 软件进行 UPGMA 聚类分析。

1.6 根据 SSR 分子标记数据构建核心样本

参照张春雨等 (2009) 提出的位点优先取样策略取样, 并根据平菇优良性状育种的需要进行优化。具体步骤为: 在最高相似水平的两个株系中, 具有最多稀有等位基因数的株系优先选择进入下一轮聚类, 如果两个株系具有相等数量的稀有等位基因, 稀有等位基因的等位基因频率值最小的株系被优先选择, 如果这个值仍相同, 则优先选择具有最多优良性状 (高产、抗黄斑病等) 的株系。按照以上步骤根据不同的 SSR 等位基因保留比例 (100%、95%、90%、85%、80%) 确定核心样本取样量。

1.7 核心样本代表性的评价和确认

对核心样本代表性的评价根据 SSR 等位基因保留比例 (ratio of alleles retained, R)、稀有等位基因保留比例 (ratio of rare alleles retained, R_r) 以及对每个位点的 Nei's 基因多样度和 Shannon's 信息指数进行 t 检验。对 15 个非数值型性状选择表型保留比 (ratio of phenotype retained, RPR) (李自超等, 2000), 对 9 个数值型性状选择极差符合率 (coincidence rate of range, CR) (Hu et al., 2000)、均值符合率 (coincidence rate of mean, CM) 和标准差符合率 (coincidence rate of standard deviation, CS) (张秀荣 等, 1998) 等指标来评价核心样本的遗传多样性和代表性。其中部分计算公式如下: R_r (%) = (核心样本总稀有等位基因数/原种质总稀有等位基因数) \times 100; RPR (%) = (核心样本表现型个数/原种质表现型个数) \times 100; CR (%) = [1 - (核心样本极值 - 原种质极值) / 原种质极值] \times 100; CM (%) = [1 - (核心样本均值 - 原种质均值) / 原种质均值] \times 100; CS (%) = [1 - (核心样本标准差 - 原种质标准差) / 原种质标准差] \times 100。

2 结果与分析

2.1 平菇遗传多样性分析

采用 11 对 SSR 引物扩增产物均检测到了清晰稳定的条带, 11 对 SSR 标记在 48 份平菇种质中共检测到 84 个等位基因, 不同 SSR 标记检测到的等位基因数为 5 ~ 13 个, 平均检测效率为每个标记 7.6 个; 各位点的 Nei's 基因多样性 0.5271 ~ 0.8218, 平均值为 0.6812; Shannon's 信息指数 0.9816 ~ 2.0748, 平均 Shannon's 信息指数也高达 1.4239 (表 4), 表明本研究中所选取的 11 个 SSR 位点在平菇种质中具有较丰富的多态性。

根据 11 个 SSR 引物扩增结果, 48 份种质间的遗传相似系数为 0.6429 ~ 0.9425, 其中菌株 00388 和 03764、菌株 00375 和 03853 的相似系数均为 0.9425, 出菇试验表现为子实体形态极其相近, 拮抗试验显示拮抗线不明显, 表明这两组的 2 个样本亲缘关系很近, 可能起源于同一个菌株 (唐传红等, 2005), 在相似性系数为 0.8 的较高相似性水平上, UPGMA 聚类将 48 个菌株分成 8 个类群 (图 1), 其中类群 I 和类群 III 包括的样本较多, 分别为 10 个和 18 个样本, 分别约占原种质的 20.8% 和 37.5%, 其它类群包括的样本较少 (1 ~ 5 个)。说明这些类群内样本之间的遗传背景差异都比较小, 再者聚类结果显示样本之间的遗传关系与来源地并无相关性, 这可能是长期人工选择和不同栽培区之间相互引种造成的结果。

表 4 平菇 48 个样本基于 SSRs 标记的遗传多样性
Table 4 The genetic diversity based on SSRs markers for 48 cultivars of *Pleurotus ostreatus*

引物 Primer	等位基因数 Number of alleles	Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity	Shannon's 信息指数 Shannon's information index
S26	11	0.8168	1.8975
S29	10	0.6921	1.5234
S37	6	0.6708	1.3200
S38	8	0.6482	1.2936
S41	5	0.5642	0.9816
S43	6	0.6319	1.2408
S44	7	0.7875	1.6807
S48	5	0.6198	1.1411
S49	8	0.7133	1.4696
S51	5	0.5271	1.0395
S56	13	0.8218	2.0748
平均 Average	7.6	0.6812	1.4239

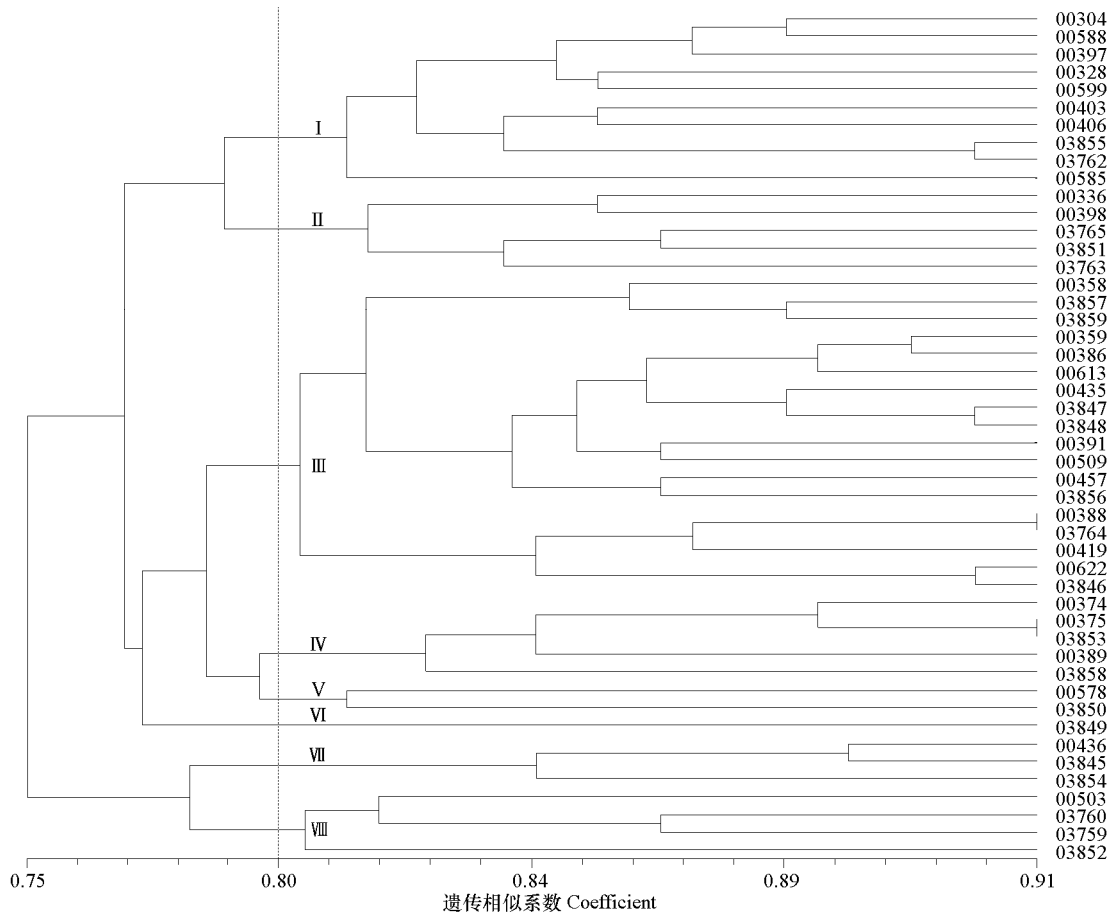


图 1 48 个平菇菌株的 SSR 聚类树状图

Fig. 1 Dendrogram by cluster analysis based on SSR genetic similarity of 48 strains for *Pleurotus ostreatus*

2.2 以不同 SSR 等位基因保留比例构建核心样本

采用位点优先取样策略抽取核心样本时，等位基因保留比例随样本量发生变化（图 2），当取样量为 35 时，保留比例仍为 100%，小于 35 个样本，等位基因数开始减少，当样本量为 6 时，保留比例仅为 58%。按照不同水平的 SSR 等位基因保留比例（100%、95%、90%、85%、80%）得到了取样量不同的 5 个核心样本 core1、core2、core3、core4 和 core5（表 5）。

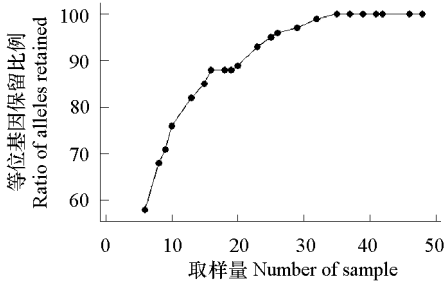


图 2 不同取样量下核心样本保留的等位基因数量

Fig. 2 The number of alleles retained in core collection with different sampling sizes for *Pleurotus ostreatus*

表 5 各核心样本的等位基因保留情况

Table 5 Information of alleles retained in each core collection for *Pleurotus ostreatus*

核心样本 Core collection	等位基因保留比例 / % Ratio of alleles retained	样本量 No. of samples	稀有等位基因保留比例 / % Ratio of rare alleles retained
core1	100	35	100
core2	95	25	92.11
core3	90	20	76.32
core4	85	15	73.70
core5	80	13	68.40

在取样过程中, 对于在最高相似性水平的两个株系如果具有相同的稀有等位基因, 则根据育种需要选取具较多优良性状的样本。例如在相似性系数为 0.94 水平上, 菌株 00375 和 03853 分为一组, 两者稀有等位基因数均为 0, 但是栽培试验中菌株 00375 (平均第一潮菇产量为每千克干料 0.43 kg) 表现出产量较菌株 03853 (平均第一潮菇产量为每千克干料 0.32 kg) 高, 因此, 菌株 00375 优先选为核心样本。

2.3 核心样本代表性的评价

从稀有等位基因保留比上看, core1 和 core2 保留比例在 80% 以上, core2 比原种质仅少了 3 个, core3、core4 和 core5 的保留比例则都不足 80%。因此, core1 和 core2 是较为合理的核心样本。尽管只有 core1 没有丢失等位基因, 但对 5 个核心样本的 11 个位点的 Nei's 基因多样性 H_e 和 Shannon's 信息指数 I 分别与原种质进行 t 检验 (表 6), 结果均没有显著性差异。说明这 5 个核心样本都能够代表原种质的遗传多样性。

表 6 基于 SSR 数据采用位点优先取样策略构建的平菇核心样本代表性

Table 6 Representation of core collection based on SSR data with allele preferred sampling for *Pleurotus ostreatus*

引物 Primer	H_e					I				
	core1	core2	core3	core4	core5	core1	core2	core3	core4	core5
S26	0.81	0.81	0.77	0.80	0.79	1.91	1.91	1.78	1.80	1.72
S29	0.71	0.75	0.77	0.77	0.74	1.69	1.72	1.81	1.74	1.63
S37	0.70	0.72	0.74	0.70	0.68	1.42	1.40	1.44	1.36	1.31
S38	0.63	0.66	0.67	0.65	0.66	1.43	1.37	1.41	1.28	1.33
S41	0.61	0.59	0.62	0.60	0.63	1.06	1.07	1.13	1.11	1.17
S43	0.65	0.65	0.67	0.69	0.71	1.30	1.27	1.33	1.38	1.45
S44	0.79	0.80	0.78	0.80	0.81	1.73	1.73	1.66	1.74	1.78
S48	0.63	0.67	0.66	0.66	0.60	1.27	1.29	1.26	1.25	1.09
S49	0.75	0.74	0.72	0.70	0.70	1.54	1.51	1.35	1.36	1.35
S51	0.60	0.63	0.64	0.67	0.68	1.22	1.24	1.26	1.32	1.35
S56	0.85	0.85	0.84	0.84	0.84	2.21	2.22	2.12	2.06	2.05

2.4 核心样本的确认

采用表型性状对位点优先取样策略构建的 5 个核心样本的代表性进一步确认。表 7 显示, core1、core2、core3 的 15 个非数值型性状的表型保留比例均在 80% 以上。而 core4 和 core5 的子实体发生

表 7 各核心样本表型保留比例

Table 7 Ratio of phenotype retained in each core collection for *Pleurotus ostreatus*

%

性状 Trait	core1	core2	core3	core4	core5
气生菌丝发达程度 Aerial hyphae development	100	100	100	100	100
耐高温能力 Thermotolerance of hyphae	100	100	100	83	83
子实体发生型 Type of fruiting	100	100	100	67	67
子实体初期颜色 Color of primordium	100	100	100	67	67
子实体采收期颜色 Color of cap for harvest	100	100	86	71	71
菌盖截面形态 Shape of cap in longitudinal section	100	100	100	100	100
菌盖长宽比 Ratio of cap height/diameter	100	100	100	100	100
菌盖质地 Texture of cap	100	100	100	100	100
菌褶网纹 Network of decurrent gills	100	100	100	100	100
菌褶颜色 Color of gill	100	100	100	100	100
菌柄着生方式 Attachment of stipe for cap	100	100	100	100	100
菌柄形态 Shape of stipe	100	100	100	80	80
菌柄颜色 Color of stipe	100	100	100	100	100
菌柄着生毛 Attachment of villus for stipe	100	100	100	100	100
菌柄质地 Texture of stipe	100	100	100	100	100

类型、子实体初期颜色和采收期颜色 3 个非数值型性状的保留比例小于 80%。根据李自超等（2000）核心样本表型保留比例大于 80%时可代表原始库的评价原则，core1、core2 和 core3 能够完全代表原种质的 15 个非数值型性状的遗传多样性，为合理有效的核心样本。而 core1 和 core2，比 core3 能更好的代表原种质。

比较 5 个核心样本的 9 个数值型性状的极差、均值和标准差的符合率可以看出，core1 和 core2 的 3 个参数符合率均在 80%以上（表 8），而 core3、core4 和 core5 均有部分性状的符合率小于 80%，根据 Hu 等（2000）认为核心样本的极差符合率大于 80%以及张秀荣等（1998）认为均值和标准差符合率大于 80%均能代表原种质遗传多样性的评价原则，则 core1 和 core2 能够完全代表原种质的 9 个数值型性状的遗传多样性，为合理有效的核心样本。

表 8 5 个核心样本极差符合率（CR）、均值符合率（CM）和标准差符合率（CS）的比较
Table 8 Coincidence rate of range (CR), mean (CM) and standard deviation (CS)

核心样本 Core collection	项目 Item	in five core collections for <i>Pleurotus ostreatus</i>							/%	
		菌丝生长速度 Mycelium growth rate on PDA medium	产量 Yeild	菌龄 Hyphae age	栽培料生长速度 Mycelium growth rate on culture medium	菌盖 Cap	菌柄 Stipe			
		长径 Long diameter	短径 Short diameter	厚度 Thickness	长度 Length	直径 Diameter				
core1	CR	100	100	100	100	100	100	89	100	100
	CM	98	87	100	100	99	99	97	98	99
	CS	93	98	99	99	95	95	96	97	100
core2	CR	94	100	100	100	100	100	89	100	94
	CM	100	89	100	99	100	99	95	94	98
	CS	97	88	99	99	89	86	88	98	94
core3	CR	71	100	100	100	100	100	89	100	78
	CM	99	88	99	100	99	99	96	92	95
	CS	85	91	94	91	90	90	86	98	73
core4	CR	71	100	100	100	100	100	89	100	78
	CM	97	98	99	100	99	99	95	98	95
	CS	89	97	82	79	98	99	78	88	77
core5	CR	56	100	100	100	100	100	89	100	78
	CM	94	99	99	99	99	99	92	97	95
	CS	83	100	73	73	98	98	72	87	83

综上所述，采用表型性状对 5 个核心样本代表性的确认结果显示：core1 和 core2 的稀有等位基因保留比例，15 个非数值型性状表型保留比例，9 个数值型性状的极差、均值和标准差符合率均在 80%以上，而且对 Nei’s 基因多样度和 Shannon’s 信息指数进行 *t* 检验均无显著差异。表明这两个核心样本无论从基因水平还是从表型水平都能够代表原种质的遗传多样性，而 core2 样本量更少，符合核心样本以最少的资源数最大限度的代表其遗传多样性的原则。最终抽取 25 份样本（表 1 中标注√的样本），约占原种质的 52%，其中类群 I 中有 6 份（占该类群的 60%），包括了低温（5~18℃）、中高温（10~30℃）、广温（5~28℃）3 种出菇温型以及暗灰褐色、灰色、乳白色 3 种子实体颜色；类群 II 中有 3 份（占该类群的 60%），包括灰色、暗黄褐色、深灰色 3 个不同子实体颜色的低温品种；类群 III 中有 5 份（占该类群的 28%），包括白色、灰色、暗灰褐色的低温品种以及灰色的广温耐高温（5~30℃）品种；类群 IV 中有 3 份（占该类群的 60%），除去的两份样本与核心样本 00374 的出菇温型和子实体颜色均相同；类群 V 和类群 VI 的全部样本均选为核心样本，类群 VII 和类群 VIII 中均除去一份样本。从出菇温型和子实体颜色也可以看出，这些核心样本能够代表原种质的遗传变异。

3 讨论

食用菌的形态分化多样性远低于绿色植物（张金霞 等，2005），且易受形态环境影响而不稳定，

导致以形态性状进行遗传多样性评价和构建核心种质的困难。本研究中利用 SSR 分子标记评价平菇栽培种质间的遗传多样性, 避免了环境因子对表型造成的不确定性, 能够真实准确的反映栽培种质间的遗传关系, 便于核心样本的构建, 但本研究筛选的 11 个 SSR 位点, 仅分布在糙皮侧耳全基因组 12 个 nuclear scaffold 中的 4 个 (Ruiz-Duenas et al., 2011), 所以对于该平菇种质遗传多样性的检测还不够全面, 尽管糙皮侧耳全基因组序列已测序完成, 但覆盖糙皮侧耳全基因组范围的 SSR 位点还需要进一步开发。

取样策略是核心种质构建的关键步骤, 因为入选为核心种质的样本反映了原种质的遗传多样性。根据核心种质的概念, 核心种质应该最大限度地代表原种质的遗传多样性, 而原种质的遗传多样性依靠所有位点的等位基因数和等位基因频率 (Marshall & Brown, 1975; Weir, 1989)。因此, 核心种质应尽可能保留原种质的等位基因多样性。由于稀有等位基因可以提供独特的进化副产品, 它们可能赋予该物种有利的特性来适应可能的环境变化, 因此在生物多样性中具有重要作用 (Richter et al., 1994; Bengtsson et al., 1995)。为了保留等位基因多样性, 张春雨等 (2009) 提出的位点优先取样策略, 可以最大限度地保留稀有等位基因, 本研究在此基础上考虑到育种目的, 对具有相同稀有等位基因的样本, 优先选择优良性状多的样本, 更加符合构建核心样本的目的。

确定合理的取样量是构建核心种质的另一重要环节, 各种核心种质构建中往往根据原始群体的大小调整抽样比率。对于大容量的资源群体一般采用较低的抽样比率, 而较小的群体则采用较高的抽样比率 (徐海明 等, 2004)。此外, 由于不同物种的遗传结构和基因组遗传重复程度存在差异, 利用 DNA 分子标记构建核心种质, 取样比例也可能存在差异 (王丽侠 等, 2004)。随着核心种质容量的变小, 保存的遗传变异及结构对其容量的大小将非常敏感。本研究应用的 48 个栽培品种的原种质是在经鉴定鉴别的 249 个初始样本基础上压缩而形成的, 提出的根据等位基因保留比例确定取样量, 保证了在遗传基因完整性的基础上进一步压缩种质。

本研究中只是对食用菌栽培品种核心样本构建方法的一个尝试, 构建策略上的研究还不够深入, 科学有效清晰的食用菌核心样本的构建还有相当大量的工作要做。

References

- Bengtsson B O, Weibull P, Ghatnekar L. 1995. The loss of alleles by sampling: A study of the common outbreeding grass *Festuca ovina* over three geographical scales. *Hereditas*, 122: 221 - 238.
- Ebana K, Kojima Y, Fukuoka S, Nagamine T, Kawase M. 2008. Development of mini core collection of Japanese rice landrace. *Breeding Science*, 58: 281 - 291.
- Fu Li-zhong, Wu Xue-qian, Wu Qing-qi, Wei Hai-long, Li Hai-bo, Jia Ya-ni, Sun Min-hua. 2005. Current situation and countermeasures of germplasm resource of edible fungi in China. *Journal of Zhejiang Forest Science and Technology*, 25 (5): 43 - 48. (in Chinese)
- 付立忠, 吴学谦, 吴庆其, 魏海龙, 李海波, 贾亚妮, 孙敏华. 2005. 我国食用菌种质资源现状及其发展趋势. *浙江林业科技*, 25 (5): 43 - 48.
- 关景奎. 2011. 小蘑菇成为我国创汇大产业. *农产品加工: 创新版*, (2): 15 - 16.
- Hu J, Zhu J, Xu H M. 2000. Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 264 - 268.
- Japan Edible Mushroom Spawn Association. 1978. Seed and seedling characteristics classification investigation report: *Pleurotus ostreatus*. Tokyo, Japan.
- 日本食用菌种协会. 1978. 昭和 52 年度种苗特性分类调查报告书: 糙皮侧耳. 日本东京.
- Kai S, Tanaka H, Hashiguchi M, Iwata H, Akashi R. 2010. Analysis of genetic diversity and morphological traits of Japanese *Lotus japonicas* for establishment of a core collection. *Breeding Science*, 60: 436 - 446.
- Li Zi-chao, Zhang Hong-liang, Zeng Ya-wen, Yang Zhong-yi, Shen Shi-quan, Sun Chuan-qing, Wang Xiang-kun. 2000. Study on sampling schemes

- of core collection of local varieties of rice in Yunan, China. *Scientia Agricultura Sinica*, 33 (5): 1 - 7. (in Chinese)
- 李自超, 张洪亮, 曾亚文, 杨忠义, 申时全, 孙传清, 王象坤. 2000. 云南地方稻种核心种质取样方案研究. *中国农业科学*, 33 (5): 1 - 7.
- Ma K H, Lee G A, Gwag J G, Kim T S, Kong W S, Seo K I, Lee G S, Park Y J. 2009. Development and characterization of new microsatellite markers for the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Journal of Microbiology Biotechnology*, 19 (9): 851 - 857.
- Marshall D R, Brown A H D. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation // Frankel O H, Hawkes J G. *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge: Cambridge University Press: 53 - 80.
- Moquet F, Ramos M G L. 1997. Optimum measure of cap color in *Agaricus bisporus* wild and cultivated strains. *Journal of food science*, 62 (5): 1054 - 1079.
- Richter T S, Soltis P S, Soltis D E. 1994. Genetic variation within and among population of the narrow endemic, *Delphinium viridescens* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, 81 (8): 1070 - 1076.
- Ruiz-Duenas F J, Fernandez F, Martinez M J, Martinez A T. 2011. *Pleurotus ostreatus* peroxidases: An in silico analysis from the genome sequence to the enzyme molecular structure. *Comptes Rendus Biologies*, 334: 795 - 805.
- Tang Chuan-hong, Zhang Jin-song, Chen Ming-jie, Li Tai-hui, Cao Hui. 2005. Study on classification of strains of *Ganoderma* by antagonistic effect and RAPD. *Microbiology*, 32 (5): 72 - 76. (in Chinese)
- 唐传红, 张劲松, 陈明杰, 李泰辉, 曹 晖. 2005. 利用拮抗试验和 RAPD 对灵芝属菌株进行分类研究. *微生物通报*, 32 (5): 72 - 76.
- Wang Li-xia, Li Ying-hui, Li Wei, Zhu Li, Guan Yuan, Ning Xue-cheng, Guan Rong-xia, Liu Zhang-xiong, Chang Ru-zhen, Qiu Li-juan. 2004. Establishment of a core collection of Changjiang spring sowing soybean. *Biodiversity*, 12 (6): 578 - 585. (in Chinese)
- 王丽侠, 李英慧, 李 伟, 朱 莉, 关 媛, 宁学成, 关荣霞, 刘章雄, 常汝镇, 邱丽娟. 2004. 长江春大豆核心种质构建及分析. *生物多样性*, 12 (6): 578 - 585.
- Weir B S. 1989. Sampling properties of gene diversity // Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.: 23 - 42.
- Xu Hai-ming, Qiu Ying-xiong, Hu Jin, Wang Jian-cheng. 2004. Methods of constructing core collection of crop germplasm by comparing different genetic distances, cluster methods and sampling strategies. *Acta Agronomica Sinica*, 30 (9): 932 - 936. (in Chinese)
- 徐海明, 邱英雄, 胡 晋, 王建成. 2004. 不同遗传距离聚类 and 抽样方法构建作物核心种质的比较. *作物学报*, 30 (9): 932 - 936.
- Yao Qi-lun, Fang Ping, Yang Ke-cheng, Pan Guang-tang. 2009. Methods of constructing a core collection of maize landraces in southwest China based on SSR data. *Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences*, 35 (3): 225 - 228. (in Chinese)
- 姚启伦, 方 平, 杨克诚, 潘光堂. 2009. 基于 SSR 标记构建西南玉米地方品种核心种质的方法. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 35 (3): 225 - 228.
- Zhang Chun-yu, Chen Xue-sen, Zhang Yan-min, Yuan Zhao-he, Liu Zun-chun, Wang Yan-ling, Lin Qun. 2009. A method for constructing core collection of *Malus sieversii* using molecular markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (2): 597 - 604. (in Chinese)
- 张春雨, 陈学森, 张艳敏, 苑兆和, 刘遵春, 王延龄, 林 群. 2009. 采用分子标记构建新疆野苹果核心种质的方法. *中国农业科学*, 42 (2): 597 - 604.
- Zhang Jin-xia, Huang Chen-yang, Hu Qing-xiu. 2005. Edible mushroom species identification and species protection technology. *Edible Fungi of China*, 24 (4): 14 - 16. (in Chinese)
- 张金霞, 黄晨阳, 胡清秀. 2005. 食用菌品种鉴定及品种保护技术. *中国食用菌*, 24 (4): 14 - 16.
- Zhang Jin-xia, Xie Bao-gui. 2006. Handbook for production and management of edible mushroom spawn. Beijing: China Agriculture Press: 4. (in Chinese)
- 张金霞, 谢宝贵. 2006. 食用菌菌种生产与管理手册. 北京: 中国农业出版社: 4.
- Zhang Xiu-rong, Guo Qing-yuan, Zhao Ying-zhong, Feng Xiang-yun. 1998. Establishment of sesame germplasm core collection in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 31 (3): 49 - 55. (in Chinese)
- 张秀荣, 郭庆元, 赵应忠, 冯祥云. 1998. 中国芝麻资源核心收集品研究. *中国农业科学*, 31 (3): 49 - 55.