

基于拮抗及 ITS 序列分析的河南香菇主产区 种质资源鉴定及遗传多样性分析

崔筱¹, 刘芹¹, 孔维丽¹, 张玉亭¹,

胡素娟¹, 王彦坡², 康源春¹, 孔维威¹, 袁瑞奇¹

(1. 河南省农业科学院植物营养与资源环境研究所 郑州 450002; 2. 西峡县食用菌生产办公室 河南西峡 474599)

摘要:应用核糖体基因转录间隔区域(Internal Transcribed Spacer, ITS)序列及拮抗法对河南食用菌主产区香菇栽培菌株进行鉴定,并分析遗传多样性。以收集的 41 个香菇栽培菌株为样本,两两之间进行拮抗测试分析,提取 DNA 并进行 PCR 扩增、回收、测序,采用比邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树。结果表明,16 个差异菌株拮抗现象明显,其余菌株无拮抗或者拮抗不显著,41 个香菇菌株初步分为 16 个不同菌株及 7 个不同亚种;ITS 序列比对及系统发育分析将 41 个香菇品种聚为独立进化的 4 个大类,即 3 个不同的菌株和 8 个不同的亚种,种内遗传距离为 0.000 0~0.006 5,与 *Pleurotus ostreatus* (KY962509)种间遗传距离为 0.374 0。综上所述,“ITS+拮抗法”结合可以明确区分菌株间拮抗、无拮抗及拮抗不明显现象基因序列的相似度、遗传距离的差异及亲缘关系的远近,为香菇品种的鉴定提供理论支撑。

关键词:香菇;ITS;拮抗鉴定;遗传多样性分析

中图分类号: S646

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2022)07-031-08

Identification of germplasms and genetic diversity of *Lentinus edodes* from main production areas in Henan province based on antagonism and ITS sequence analysis

CUI Xia¹, LIU Qin¹, KONG Weili¹, ZHANG Yuting¹, HU Sujuan¹, WANG Yanpo², KANG Yuanchun¹, KONG Weiwei¹, YUAN Ruiqi¹

(1. Institute of Plant Nutrition, Agricultural Resources and Environmental Science, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China; 2. Xixia Edible Fungus Production Office, Xixia 474599, Henan, China)

Abstract: Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence and antagonism were used to identify and analyze the genetic diversity of *Lentinus edodes* isolated from the main producing area of edible fungi in Henan. The 41 cultivated *L. edodes* strains from the main producing areas of edible fungi in the province were collected as samples, and the antagonism test was conducted between pairs, and DNA of the samples were extracted, amplified by PCR, recovered and sequenced, and a phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining (NJ) method. The results showed that: The antagonism was obvious in 16 different strains, while the rest showed no or insignificant antagonism, and the 41 *L. edodes* strains were divided into 16 different strains and 7 different subspecies; ITS sequence alignment and phylogenetic analysis clustered 41 *L. edodes* strains into independently evolved 4 broad classes, 3 different strains and 8 different subspecies and the intraspecific genetic distances were between 0.000 0 and 0.006 5, of which the interspecific genetic distance with *Pleurotus ostreatus* (KY962509) is 0.374. The combination of “ITS + antagonism” method could clearly distinguish the similarity of gene sequence of the phenomenon of antagonism, no antagonism and antagonism of which is notobvious, genetic distance and relationship between strains, which provide theoretical support for the identification of *L. edodes* varieties.

Key words: *Lentinus edodes*; ITS; Antagonistic identification; Genetic diversity analysis

收稿日期: 2022-01-10; 修回日期: 2022-05-14

基金项目: 河南省现代农业产业技术体系专项资金(S2013-09, S2013-09-G02); 河南省农业科学院自主创新项目(2022ZC31); 河南省重大公益性专项基金(201300110700)

作者简介: 崔筱, 女, 助理研究员, 主要从事食用菌育种及功能基因研究。E-mail: cuixiao21255@163.com

通信作者: 孔维丽, 女, 研究员, 主要从事食用菌育种及平菇发酵料栽培机制研究。E-mail: kongweili2005@126.com

香菇(*Lentinus edodes*)隶属于真菌门担子菌纲香菇属^[1],是世界上重要的食用菌栽培品种之一。中国是世界上最大的香菇生产国,2020年我国香菇总产量为1 188.21万t^[2],占全国食用菌生产总量(4 061.43万t)的29.26%。我国香菇生产基地分布于河南、河北、湖北、浙江、福建、贵州、黑龙江等省,其中,河南省2020年香菇产量为365.08万t,占河南省食用菌产量(561.85万t)的64.98%,居全国第一位^[2]。河南省香菇栽培主要分布在南阳西峡、南召、桐柏,三门峡卢氏、灵宝,驻马店泌阳、驿城区,平顶山汝州、鲁山等地,栽培规模接近30亿棒。但生产中由于引种混乱,同名异种、同种异名现象频发,伤农害农事件屡次出现。河南省农业科学院植物营养与资源环境研究所食用菌团队前期采用模糊数学和聚类分析的方法对河南省种质资源库保存的香菇表型性状进行评价,但无法确定品种基因序列遗传差异^[3],厘清菌株之间的差异性、避免香菇菌株的混淆是推动香菇产业健康发展的必要路径。随着分子生物学的发展,SSR^[4-5]、RAPD^[6-7]、ITS^[8-11]等方法在香菇、平菇、灵芝等食用菌种群的系统发育和遗传多样性鉴定中广泛应用。而拮抗法是传统的菌株鉴定方法,传统鉴定和分子生物学鉴定相结合能够较好地鉴定食用菌种内种质资源的

特异性。前期,笔者已通过“拮抗+ITS”序列分析相结合的方法鉴定了54个平菇菌株^[12],笔者以河南省内香菇生产大县的不同菌种企业和栽培基地收集到的41份香菇菌株为研究对象,应用“ITS+拮抗”相结合的方法进行菌种鉴定和遗传多样性分析,进而为香菇种质资源鉴定提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

参试菌株为收集的河南省内栽培香菇菌株41个,编号及来源见表1。

母种培养基为PDA综合培养基,购自北京奥博星生物技术有限责任公司的PDA基础培养基40 g·L⁻¹,蛋白胨2 g·L⁻¹,KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹,MgSO₄ 0.5 g·L⁻¹。主要试剂及引物为Taq PCR Master Mix聚合酶、DNA纯化试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、PCR扩增试剂及4sGelRed染液,均购自上海生工有限公司;pMD-18T载体、大肠杆菌DH5 α 感受态细胞购自宝生物工程(大连)有限公司;rDNA ITS分析所用的ITS通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')购自上海生工生物工程有限公司。

表1 供试香菇菌株

编号	名称	引进单位(地)	编号	名称	引进单位(地)
LE-1	香9608	西峡县寨根香菇基地	LE-22	联迪DM-12	汝州市联迪农业科技有限公司
LE-2	香931-2	西峡县重阳香菇基地	LE-23	联迪DM-13	汝州市联迪农业科技有限公司
LE-3	L18	西峡县西平香菇基地	LE-24	联迪DM-18	汝州市联迪农业科技有限公司
LE-4	灵仙1号	西峡县石界河香菇基地	LE-25	灵仙1号-1	三门峡市农业科学院
LE-5	灵仙1号-5	驿城区香菇种植基地	LE-26	灵仙1号-2	灵宝香菇基地
LE-6	雨花3号	泌阳真菌研究所	LE-27	灵仙1号-3分	灵宝香菇基地
LE-7	武香1号-2	陕州区香菇种植基地	LE-28	南山1号-3	汝州朱寨香菇基地
LE-8	申香215	西峡县食用菌科研中心	LE-29	香菇分	西峡双龙镇香菇种植基地
LE-9	沪农1号	卢氏县狮子坪乡向阳园艺场	LE-30	卢香	卢氏林海兴华农业发展有限公司
LE-10	庆元2号	卢氏县狮子坪乡向阳园艺场	LE-31	豫香1号	三门峡市农业科学院
LE-11	香25	南召县板山坪镇香菇种植基地	LE-32	夏1	汝州香菇种植基地
LE-12	香27	卢氏官坡香菇种植基地	LE-33	香808	河南省食用菌种质资源库
LE-13	香939	泌阳县高邑乡香菇种植基地	LE-34	香931	河南省食用菌种质资源库
LE-14	香LS-1	卢氏林海兴华农业发展有限公司	LE-35	香ZX-4	驻马店市农业科学院
LE-15	香平顶18-04	鲁山香菇基地	LE-36	香939 1-2	周口市农业科学院
LE-16	联迪ZXL-2	汝州市联迪农业科技有限公司	LE-37	香升龙1-1	西峡百菌园食用菌有限公司
LE-17	联迪ZXL-3	汝州市联迪农业科技有限公司	LE-38	香856	河南省食用菌种质资源库
LE-18	联迪ZSL-8	汝州市联迪农业科技有限公司	LE-39	香泌阳18-1	泌阳县禹庄村香菇生产基地
LE-19	联迪CGL-9	汝州市联迪农业科技有限公司	LE-40	泌阳17	泌阳县高邑乡香菇种植基地
LE-20	联迪CGL-10	汝州市联迪农业科技有限公司	LE-41	香泌阳18-2	泌阳县禹庄村香菇生产基地
LE-21	联迪CGL-11	汝州市联迪农业科技有限公司			

1.2 方法

1.2.1 拮抗试验 2021年6—8月收集河南省科研单位、企业及种植户栽培的香菇品种,2021年10月,在河南省农业科学院植物营养与资源环境研究所将收集到的41份香菇菌株在PDA综合培养基上经活化后,采用直径5 mm的打孔器打取各菌株种块于直径90 mm培养皿内对峙培养,每皿放置6个菌块,种块间距1.0 cm,每个菌株3次重复,于25℃培养7 d,按照拮抗试验国家标准的方法观察记录41份参试菌株两两之间的拮抗线的形态。

1.2.2 DNA提取 将培养的香菇菌丝体置于1.5 mL无菌离心管中,在全自动快速研磨仪中研磨成粉,提取各样品的基因组DNA,基因组DNA提取采用微波法^[13],采用1.0%的琼脂糖凝胶检测DNA样品质量和浓度,-20℃保存备用。

1.2.3 PCR扩增 选用引物ITS1(5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')^[14]。PCR反应体系:DNA模板1.0 μL, *Taq* PCR Master Mix 聚合酶12.5 μL,上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各1.0 μL, ddH₂O 4.5 μL。反应程序:95℃ 5 min, 95℃ 1 min, 58℃ 30 s, 72℃ 50 s, 72℃ 10 min, 30个循环。

1.2.4 PCR产物检测及测序扩增 反应完毕后,取5.0 μL的PCR产物与1.0 μL 4sGelRed 染液混合,加样于琼脂糖凝胶点样孔中进行电泳,电泳结束后,全自动凝胶成像分析仪JS-680D下检测扩增条带。回收正确的扩增条带(700~800 bp)连于pMD-18T载体上,将连接产物转化于大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α菌株感受态细胞,涂布在含有Amp的LB固体培养基上,37℃培养过夜,菌落PCR法验证单克隆大肠杆菌菌株,将验证正确的大肠杆菌菌株送北京六合华大基因科技有限公司测序。

1.2.5 数据分析 测序获得的序列经DNAMAN软件多序列比对重排后,于NCBI数据库上比对,采用MEGA-X软件计算遗传距离,以Genebank中平菇(*Pleurotus ostreatus*)为外类群,构建基于ITS序列的系统进化树^[15]。

2 结果与分析

2.1 拮抗结果分析

41个香菇菌株共设计拮抗组合861组,拮抗现象明显的有480组,占55.75%;拮抗现象不明显的有298组,占34.61%;无拮抗的有83组,占9.64%。其中,香9608(LE-1)、香931-2(LE-2)、庆

元2号(LE-10)、香939(LE-13)、香LS-1(LE-14)、灵仙1号-1(LE-25)、香931(LE-34)、香升龙1-1(LE-37)、香856(LE-38)、香泌阳18-1(LE-39)、泌阳17(LE-40)、香泌阳18-2(LE-41)之间无拮抗,与其他各菌株之间拮抗明显,表明这些菌株亲缘关系较近,初步鉴定为同一菌株;同理,朕迪CGL-10(LE-20)、豫香1号(LE-31)之间无拮抗,与其他各菌株之间拮抗明显,表明这些菌株亲缘关系较近,为同一菌株;DM-18(LE-24)、灵仙1号-3分(LE-27)之间无拮抗,与其他各菌株之间拮抗,明显被鉴定为同一菌株;灵仙1号(LE-4)、灵仙1号-5(LE-5)、雨花3号(LE-6)、申香215(LE-8)、朕迪XZL-3(LE-17)、朕迪ZSL-8(LE-18)之间无拮抗,与其他各菌株间拮抗不明显,鉴定为同一菌株;L18(LE-3)、沪农1号(LE-9)、朕迪CGL-9(LE-19)、朕迪CGL-11(LE-21)、朕迪DM-12(LE-22)、朕迪DM-13(LE-23)、灵仙1号-2(LE-26)、南山1号-3(LE-28)、香菇分(LE-29)、卢香(LE-30)、香808(LE-33)、香ZX-4(LE-35)、香939 1-2(LE-36)与其他各菌株之间拮抗明显,表明这些菌株亲缘关系较远;武香1号-2(LE-7)、香25(LE-11)、香27(LE-12)、香平顶18-04(LE-15)、朕迪XZL-2(LE-16)、夏1(LE-32)与其他各菌株间拮抗不明显,鉴定为疑似同一菌株。拮抗试验结果可将41个香菇菌株初步分为16个不同菌株及7个不同亚种(图1~2)。

2.2 rDNA ITS区段PCR测序及NCBI比对结果

41株香菇菌株的rDNA ITS区段PCR扩增均扩增到了目的条带。经电泳检测,扩增条带在700~800 bp之间,符合测序要求。经检验条带正确的阳性克隆菌液测序后,将测序正确的核酸序列提交到NCBI数据库获得Genebank登录号,并与Genebank核酸序列数据库进行BLAST比对,得到与其最相似的物种名、登记号及序列相似性。结果表明,41个菌株核酸序列在NCBI上的序列相似性在99.17%~100%(表2),均为香菇*L. edodes*。

2.3 各菌株ITS序列比对分析

将经测序的香菇属的41个菌株之间进一步进行ITS序列比对分析,结果表明,沪农1号(LE-9)与其他各菌株的序列相似性在95.97%~96.4%,为单一菌株;香931-2(LE-2)、灵仙1号(LE-4)、灵仙1号-5(LE-5)、申香215(LE-8)、香27(LE-12)、香939(LE-13)、香LS-1(LE-14)、香平顶18-04(LE-15)、朕迪XZL-2(LE-16)、朕迪ZSL-8(LE-18)、朕迪CGL-9(LE-19)、朕迪CGL-10(LE-20)、朕迪

表2 供试菌株在 NCBI 数据库中比对结果

编号	保存编号	Genbank 登录号	NCBI 比对结果	序列相似性/%
LE-1	19XZ001	OM743796	<i>Lentinula edodes</i> KY494534.1	100.00
LE-2	20XN001	OM743797	<i>Lentinula edodes</i> MH856832.1	100.00
LE-3	19HZK001	OM743798	<i>Lentinula edodes</i> KY494570.1	100.00
LE-4	20HZK002	OM743799	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	100.00
LE-5	21WJ001	OM743800	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	100.00
LE-6	21BZ001	OM743801	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	99.58
LE-7	20SZ001	OM743802	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	99.72
LE-8	19SH001	OM743803	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	99.86
LE-9	20PX001	OM743804	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	99.86
LE-10	21ZN001	OM743805	<i>Lentinula edodes</i> KY494534.1	99.86
LE-11	20HZK003	OM743806	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	99.17
LE-12	20HZK004	OM743807	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	100.00
LE-13	20HZK005	OM743808	<i>Lentinula edodes</i> KY494531.1	100.00
LE-14	20LH001	OM743809	<i>Lentinula edodes</i> MH856832.1	100.00
LE-15	19LX001	OM743810	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	100.00
LE-16	20RD001	OM743811	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	99.86
LE-17	20RD002	OM743812	<i>Lentinula edodes</i> KY494492.1	99.86
LE-18	20RD003	OM743813	<i>Lentinula edodes</i> KY494492.1	100.00
LE-19	20RD004	OM743814	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	99.86
LE-20	20RD005	OM743815	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	100.00
LE-21	20RD006	OM743816	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	100.00
LE-22	20RD007	OM743817	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	100.00
LE-23	20RD008	OM743818	<i>Lentinula edodes</i> KY494492.1	100.00
LE-24	20RD009	OM743819	<i>Lentinula edodes</i> KY494492.1	100.00
LE-25	20SN001	OM743820	<i>Lentinula edodes</i> MH856832.1	100.00
LE-26	20LX002	OM743821	<i>Lentinula edodes</i> KY494492.1	100.00
LE-27	20LX003	OM743822	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	99.86
LE-28	21LK001	OM743823	<i>Lentinula edodes</i> KY494570.1	100.00
LE-29	20XS001	OM743824	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	100.00
LE-30	20LH002	OM743825	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	100.00
LE-31	20SN002	OM743826	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	99.72
LE-32	20RZ001	OM743827	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	99.86
LE-33	21HZK006	OM743828	<i>Lentinula edodes</i> KY494492.1	100.00
LE-34	21HZK007	OM743829	<i>Lentinula edodes</i> MH856832.1	99.86
LE-35	20ZMD001	OM743830	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	100.00
LE-36	20ZK001	OM743831	<i>Lentinula edodes</i> MT358336.1	100.00
LE-37	20XB001	OM743832	<i>Lentinula edodes</i> MH856832.1	100.00
LE-38	20HZK008	OM743833	<i>Lentinula edodes</i> KY494570.1	100.00
LE-39	20BY001	OM743834	<i>Lentinula edodes</i> MH856832.1	100.00
LE-40	20BG001	OM743835	<i>Lentinula edodes</i> KY494570.1	100.00
LE-41	20BY002	OM743836	<i>Lentinula edodes</i> MH856832.1	100.00

CGL-11(LE-21)、朕迪 DM-12(LE-22)、朕迪 DM-13(LE-23)、朕迪 DM-18(LE-24)、灵仙 1 号-1(LE-25)、灵仙 1 号-2(LE-26)、灵仙 1 号-3 分(LE-27)、香菇分(LE-29)、卢香(LE-30)、夏 1(LE-32)、香 808(LE-33)、香 ZX-4(LE-35)、香 939 1-2(LE-36)、香升龙 1-1(LE-37)、香 856(LE-38)、香泌阳 18-1(LE-39)、泌阳 17(LE-40)、香泌阳 18-2(LE-41)与其他菌株之间的序列相似性在 99.9%~

100%,为同一菌株;L18(LE-3)与南山 1 号-3(LE-28)序列相似性为 100%,为同一菌株;香 9608(LE-1)、雨花 3 号(LE-6)、武香 1 号-2(LE-7)、庆元 2 号(LE-10)、香 25(LE-11)、朕迪 XZL-3(LE-17)、豫香 1 号(LE-31)、香 931(LE-34)与其他菌株序列相似性在 98.07%~99.86%之间,为不同的亚种;41 个菌株可分为 3 个不同的菌株和 8 个不同的亚种。

2.4 基于ITS序列的系统发育分析

经测序获得41株供试菌的ITS序列长度为718~724 bp,与GeneBank数据库中的香菇菌种的ITS序列相似度为99%以上(表2),初步认定41株供试菌株为香菇菌株。根据Kimura-2参数的遗传距离模型计算各样本序列间的遗传距离(数据未提供),41份香菇的遗传距离在0.000 0~0.006 5之间。其中,沪农1号与其他菌株的遗传距离在0.000 0~0.004 8之间,香9608(LE-1)与豫香1号(LE-31)的遗传距离最远,为0.006 5,且豫香1号与其他各菌株的遗传距离在0.003 232~0.004 8之间,遗传距离也较远;香931-2(LE-2)、L18(LE-3)、沪农

1号(LE-9)、庆元2号(LE-10)、香939(LE-13)、香LS-1(LE-14)、朕迪XZL-2(LE-16)、朕迪DM-13(LE-23)、灵仙1号-1(LE-25)、夏1(LE-32)、香931(LE-34)、香939 1-2(LE-36)与其他各菌株的遗传距离在0.001 6~0.004 8之间,遗传距离相对较远。在Genebank中下载平菇*P. ostreatus*(KY962509)ITS序列,长度为640 bp,将其作为外类群,与各香菇菌株的遗传距离为0.374,种间遗传距离远大于种内遗传距离。

以平菇*P. ostreatus*为组外对照,与41份香菇种质资源的ITS序列构建NJ系统进化树(图3),分析系统进化树的数值结果可以发现,41份香菇品种

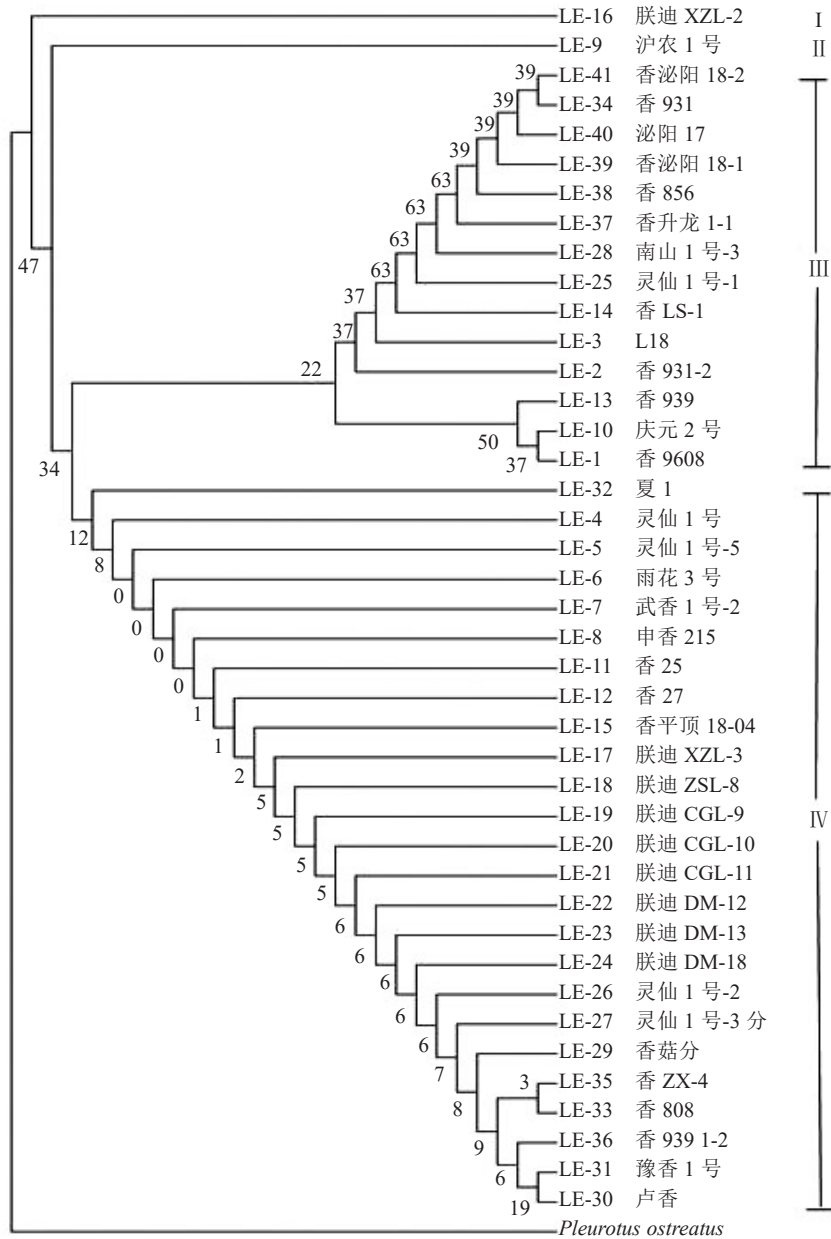


图3 基于41份香菇菌株ITS序列构建的系统发育树

可以聚为4个大类,4个大类遗传关系相对较远、独立进化。其中,朕迪 XZL-2(LE-16)、沪农1号(LE-9)各自独立为一支。香泌阳18-2(LE-41)、香931(LE-34)、泌阳17(LE-40)、香泌阳18-1(LE-39)、香856(LE-38)、香升龙1-1(LE-37)、南山1号-3(LE-28)、灵仙1号-1(LE-25)、香LS-1(LE-14)、L18(LE-3)、香931-2(LE-2)、香939(LE-13)、庆元2号(LE-10)、香9608(LE-1)聚为一支;香931(LE-34)、香泌阳18-2(LE-41)2个菌株组成姐妹群,其自展支持强度为39,且与泌阳17(LE-40)亲缘关系较近;香9608(LE-1)、庆元2号(LE-10)、香939(LE-13)3个菌株组成一个单系类群,其自展支持强度为50,亲缘关系较近。其余25个品种为第四支,其中,香808(LE-33)、香ZX-4(LE-35)2个菌株组成姐妹群,其自展支持强度为3;卢香(LE-30)、豫香1号(LE-31)、香9391-2(LE-36)3个菌株组成一个单系类群,其自展支持强度为6,亲缘关系较近。

3 讨论与结论

香菇在我国人工栽培历史悠久,是我国主要的食用菌栽培品种之一。随着国家精准扶贫策略的推进,香菇短、平、快的生产特性及较高的经济效益^[6],驱动我国的香菇产业进入了快速发展阶段。河南省是香菇生产大省,随着产业发展,菌种作为食用菌产业的核心,同种异名、同名异种、菌种间遗传关系问题一直未得到有效的解决,因此对香菇建立快速准确的鉴定方法是十分必要的。

微生物与微生物之间拮抗现象是一个复杂的反应过程,具有防止遗传上明显不同的个体间融合的作用,以保持个体遗传上的稳定性^[7]。拮抗反应试验可用于菌株之间亲缘关系远近的预测,在真菌分类学上被广泛应用^[8]。笔者对河南省内香菇主产区栽培的种质资源进行拮抗试验。结果表明,41个香菇菌株可确定为16个不同菌株及7个不同的亚种。其中在西峡、泌阳、卢氏香菇种植基地收集到的香菇菌株虽然命名不同,分别命名为香9608、香931-2、香939、香LS-1、灵仙1号-1、香931、香升龙1-1、香856、香泌阳18-1、泌阳17、香泌阳18-2,但这些菌株之间并无拮抗现象,可初步认定为同一菌株。在汝州收集到的命名为朕迪CGL-10的菌株与三门峡市农业科学院保藏菌株豫香1号无拮抗现象,可初步认定为同一菌株。在汝州收集到的命名为朕迪DM-18的菌株与在灵宝香菇基地命名为灵仙1

号-3分的菌株之间无拮抗现象,可初步认定为同一菌株。在西峡、驿城区、泌阳、上海市农科院、汝州收集到的命名为灵仙1号、灵仙1号-5、雨花3号、申香215、朕迪XZL-3、朕迪ZSL-8菌株之间无拮抗现象,可初步认定为同一菌株;认定为同一菌株的菌株之间还需要借鉴分子生物学测序结果进一步比对。此外,虽然三门峡市农科院保存的菌株灵仙1号-1与西峡及驿城区的灵仙1号香菇菌株名称相同,但二者拮抗现象明显,可初步认定为不同菌株。由此可见,虽然菌株间命名不同,可能为同一菌株,命名相同,却不一定是同一菌株。

物种内的遗传距离越小,则其用DNA条形码进行分类和鉴定的效果越理想^[19-20],ITS序列在种间变异大,种内保守性高,其中,ITS2序列片段较短,容易与单对引物结合,易于测序与扩增,且种间变异度高,在物种和亚种水平上的识别信息最为丰富^[21],作为一种通用的DNA条形码,在植物中已被用于近缘种的鉴定^[22-23],在丝状真菌中,也作为菌种鉴定的一种手段^[24-25]。笔者前期对河南省山区部分野生食药菌种质资源鉴定分析得出,菌株间序列相似性 $\geq 99.9\%$ 的定义为同一菌株,序列相似性为99.0%~99.9%的定义为不同亚种,序列相似性为95%~99%鉴别为相同属的不同菌株^[9]。笔者对本试验中41份样本进行DNA提取、PCR测序,并成功获得ITS序列,ITS测序分析表明,41个菌株可分为3个不同的菌株和8个不同的亚种,与前面拮抗试验香931-2(LE-2)、香939(LE-13)、香LS-1(LE-14)、灵仙1号-1(LE-25)、香升龙1-1(LE-37)、香856(LE-38)、香泌阳18-1(LE-39)、泌阳17(LE-40)、香泌阳18-2(LE-41)为相同菌株,DM-18(LE-24)与灵仙1号-3分(LE-27)为相同菌株,灵仙1号(LE-4)、灵仙1号-5(LE-5)、申香215(LE-8)为相同菌株及雨花3号(LE-6)、武香1号-2(LE-7)、香25(LE-11)、朕迪XZL-3(LE-17)与其他菌株为不同亚种的结果一致,更进一步印证了无拮抗现象的菌株间距离的远近。此结果与前期平菇种质资源的遗传多样性分析^[12]结果相似,通过“拮抗+ITS”法,可将41份香菇菌株确定为26个不同菌株及4个不同亚种。本试验结果表明,该方法可以有效地鉴定香菇种类,基本解决了河南省内香菇品种命名混乱的问题。

使用MEGA7.0软件对41株种内遗传距离进行计算,种内遗传距离在0.000 0~0.006 5之间,引用外源种*P. ostreatus*(KY962509)ITS序列作为外类群,

与各香菇菌株的遗传距离为 0.374, 种间遗传距离明显大于种内遗传距离, 说明可以使用 ITS 对供试样本进行分析鉴别。以平菇 *P. ostreatus* 为组外对照, 与 41 份香菇种质资源的 ITS 序列构建 NJ 系统进化树, 41 份香菇品种可以聚为 4 个大类, 4 个大类遗传关系相对较远、独立进化, 同时能够观察到不同种亲缘关系的远近程度。

“ITS+拮抗法”结合可以明确地区分菌株间拮抗、无拮抗及拮抗不明显现象基因序列的相似度, 遗传距离的差异及亲缘关系的远近, 本研究结果可为厘清河南省香菇品种提供理论支撑。

参考文献

- [1] 张寿橙, 赖敏男. 中国香菇栽培历史与文化[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993: 3-5.
- [2] 中国食用菌协会微信号. 2020 年度全国食用菌统计调查结果分析 <http://cfnews.com.cn/nianjian18195.html>[EB/OL]. (2021-12-29) [2022-04-12].
- [3] 刘芹, 孔维丽, 崔筱, 等. 基于模糊数学和聚类分析的香菇品种综合品质评价[J]. 中国瓜菜, 2021, 34(11): 37-46.
- [4] 张丹, 巫萍, 章炉军, 等. 基于香菇全基因组序列开发的部分 SSR 标记多态性分析与品种鉴定初探[J]. 食用菌学报, 2012, 19(4): 1-10.
- [5] 巫萍, 章炉军, 张丹, 等. 利用 SSR 标记鉴定香菇单核体及杂交后代[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 444-455.
- [6] 黄艺宁. RAPD-ISSR 分子标记联合鉴定毛木耳菌株的研究[J]. 河南农业科学, 2020, 49(7): 118-125.
- [7] 赵勇, 贺冬梅, 温亚丽, 等. 酯酶同工酶及 RAPD 技术在香菇杂种优势研究中的应用[J]. 菌物系统, 2003, 22(4): 549-556.
- [8] 徐学锋, 林范学, 程水明, 等. 中国香菇自然种质的 rDNA 遗传多样性分析[J]. 菌物学报, 2005, 24(1): 29-35.
- [9] 崔筱, 付晓雨, 胡素娟, 等. 基于 ITS 序列对河南省山区部分野生食用菌种质资源鉴定分析[J]. 天津农业科学, 2021, 27(7): 1-8.
- [10] 白树猛, 田黎. ITS 序列分析在真菌分类鉴定和分子检测中的应用[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(1): 52-53.
- [11] 熊雪, 李鹏, 廖小锋, 等. 野生马桑香菇的鉴定及其生物学特性[J]. 北方园艺, 2021(4): 118-123.
- [12] 崔筱, 刘芹, 段亚魁, 等. 平菇种质资源的遗传多样性分析[J]. 河南农业科学, 2020, 49(3): 138-144.
- [13] 田永强, 苏敏, 赵洪林, 等. 微波法快速提取丝状真菌基因组 DNA[J]. 中国抗生素杂志, 2008(11): 703-705.
- [14] WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. PCR protocols: a guide to methods and applications[M]. San Diego: Academic Press, 1990, 315-322.
- [15] 张丽娜, 荣昌鹤, 何远, 等. 常用系统发育树构建算法和软件鸟瞰[J]. 动物学研究, 2013, 34(6): 640-650.
- [16] 赵春艳, 邵丽梅, 陈旭, 等. 2015 年~2018 年我国食用菌出口情况分析[J]. 中国食用菌, 2020, 39(9): 1-7.
- [17] 刘盛荣. 杏鲍菇的遗传特性与种间杂交研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2008: 6-8.
- [18] 唐传红, 苏春丽, 张劲松, 等. 灵芝属分类学研究进展[J]. 食用菌学报, 2007, 14(3): 86-90.
- [19] MULLER T, PHILIPPI N, DANDEKAR T, et al. Distinguishing species[J]. RNA, 2007, 13(9): 1469-1472.
- [20] 任瑶瑶, 江南屏, 刘睿颖, 等. 藏药臭蒿及其近缘种药材的 ITS2DNA 条形码鉴[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1395-1400.
- [21] SONG J Y, SHI L C, LI D Z, et al. Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA[J]. PLOS ONE, 2012, 7(8): 43971.
- [22] YU N, WEI Y L, ZHANG X, et al. Barcode ITS2: a useful tool for identifying *Trachelospermum jasminoides* and a good monitor for medicine market[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 5037.
- [23] ZHANG J J, HU X, WANG P, et al. Investigation on species authenticity for herbal products of *Celastrus orbiculatus* and *Tripterygium wilfordii* from markets using ITS2 barcoding[J]. Molecules, 2018, 23(4): 967.
- [24] 张永信, 刘晓杰, 冯争光, 等. 金银花褐斑病原检测 and ITS 鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2016, 39(4): 73-77.
- [25] 王丽娟, 徐秀德, 姜钰, 等. 东北玉米苗枯病原镰孢菌 rDNAITS 鉴定[J]. 玉米科学, 2011, 19(4): 131-133.