

网络出版时间:2015-06-30 13:47 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.08.017
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150630.1347.017.html

草菇菌种退化相关分子标记的筛选

李丹青,王 杰

(华南农业大学 食品学院,广东 广州 510640)

【摘 要】 【目的】基于 SRAP 分子标记技术,筛选出与草菇(*Volvariella volvacea*)菌丝退化性状紧密连锁的分子标记,为进一步研究目标性状基因的克隆与功能奠定基础。【方法】以草菇正常生长菌株 V51(对照)与其菌丝退化菌株(VNM1~10)为材料,采用群体分离分析法分别构建 2 种草菇的近等基因池。利用 SRAP 分子标记技术,寻找两类菌株的差异片段,回收差异片段后与 pMD-18T 载体连接,构建重组质粒 pMD-VNMDF 并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,将筛选的阳性克隆测序。根据差异片段序列设计引物,将其转化成 SCAR 分子标记,并对草菇正常菌株 V51 及其菌丝退化菌株 VNM 进行扩增试验,验证该标记的真实性和可靠性。【结果】81 对 SRAP 引物组合中有 2 对引物可扩增出稳定差异条带,其中引物对 Me8-Em4 PCR 扩增出长度约 300 bp 的差异条带(命名为 VNMDf)存在于退化菌株中。对 SRAP 分子标记片段 VNMDf 回收、测序并进行序列分析发现,该片段长度为 279 bp,其核酸、氨基酸序列与编码 26S 蛋白酶体亚基的相似性分别达到 81%和 93%。利用 SCAR 特异引物对 SCAR250 可在菌丝退化菌株中稳定扩增出长度约 250 bp 片段,与预期大小(279 bp)一致,而在正常菌株中未扩增出此片段。【结论】获得了 1 条可能与草菇菌丝退化性状基因紧密连锁的 SRAP 分子标记,并将其成功转化为 SCAR 标记(SCAR250)。

【关键词】 草菇;菌种退化;SRAP;SCAR

【中图分类号】 Q789;S646.1⁺3 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-9387(2015)08-0195-07

Screening of molecular markers associated with degeneration of
Volvariella volvacea strains

LI Dan-qing, WANG Jie

(College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: 【Objective】 The aim of this paper was to screen molecular markers closely linked to hyphae degeneration of *Volvariella volvacea* using sequence related amplified polymorphism (SRAP) technique and to lay foundation for further cloning and functional analysis of target genes. 【Method】 Normal *Volvariella volvacea* V51 strains (CK) and 10 hyphae degenerate strains (VNM) were used to construct isogenic DNA pools by bulked segregation analysis (BAS) method. To find differential fragments between two types of strains, SRAP technique was used. After being recycled, differential fragments were ligated with PMD-18T vector. Then, recombinant plasmids pMD-VNMDF were transformed into *E. coli* DH5 α competent cells and positive clones were sequenced. Based on the identified fragment sequences, special primers were designed to convert target fragment into sequence-characterized amplification region (SCAR) marker. Amplification tests of normal growth strains V51 and mycelium degradation strains were performed to verify the authenticity and reliability of the marker. 【Result】 From 81 pairs of SRAP primer combinations cho-

【收稿日期】 2014-09-19
【基金项目】 高等学校博士学科点专项科研项目(20104404120011)
【作者简介】 李丹青(1989—),男,湖北随州人,在读硕士,主要从事食药真菌生物技术研究。E-mail:492847382@qq.com
【通信作者】 王 杰(1978—),女,河南驻马店人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事食药真菌生物工程研究。
E-mail:wjcasey@scau.edu.cn

sen to screen the markers linked to hyphae degeneration of straw mushroom, two could amplify stable different bands. With the primer pairs of Me8-Em4, a polymorphic fragment of 300 bp (named VNMDf) was found in the degenerate strains gene pool. By recycling, sequencing and sequence analysis, it was found that the similarities of nucleic acid sequences and amino acid sequences between the fragment VNMDf and the fragment encoding the 26S proteasome subunits were 81% and 93%, respectively. A fragment of 250 bp was stably amplified by SCAR-specific primers SCAR250 in hyphae degenerate strains, and it was not detected in normal strains. 【Conclusion】 In this study, a SRAP marker gene fragment closely linked to straw mushroom hyphae degeneration was obtained and successfully transformed into SCAR marker (SCAR250).

Key words: *Volvariella volvacea*; strain degeneration; SRAP; SCAR

草菇(*Volvariella volvacea*)是世界产量第五的重要食用菌,也是我国主要出口菇类之一。草菇品质鲜嫩,味道鲜美,营养丰富,食药兼用,在国内外素享盛名,素有“中国蘑菇”之称^[1]。同其他食用菌相比,草菇具有其独特的优势,生长周期短,从播种到收获只要 10 d 左右^[2]。而且,发展草菇产业有利于农业生态的良性循环。因此,草菇是极具发展潜力的食用菌种类。

然而在草菇的生产实践中,一个优良的菌种使用一段时间或继代培养几代后就会发生退化,严重的菌种退化现象制约了草菇产业化开发。菌种退化是菌类栽培过程中普遍存在的现象,也是生产当中迫切希望得到解决的问题。退化菌种在外部形态上表现为菌丝细弱,气生菌丝稀疏,菌丝生长缓慢,容易被杂菌污染;生产上表现为出菇期推迟,成菇数目减少,出菇不整齐,产量下降等^[3]。病毒、细菌通过潜伏感染或与菌丝体共生干扰细胞内正常的代谢活动可引起菌种退化^[4]。此外,不良环境条件,如紫外线引起 DNA 中碱基错配等,也可造成菌种退化^[5]。

到目前为止,尽管关于食用菌菌种退化的研究取得了一定的进展,但主要集中于导致退化的环境因素分析及利用有性循环、原生质体融合和遗传工程等途径进行菌株改良等方面,且这些研究主要是通过菌种的提纯复壮以及组织或单孢分离选育新菌种^[6-8]。对菌种退化机制的研究仅有关于双孢蘑菇染色体非正常性突变^[9]以及退化蛹虫草株 DNA 水平上发生突变^[10]的报道。目前尚未见到对退化草菇菌种遗传分析或草菇菌种退化机制的研究报道。

随着分子生物学的发展,利用分子标记分析生物的系统进化、遗传变异、基因定位、分离与克隆等已成为近年来研究的热点。自从 1992 年 Khush 等^[11]首次报道用 PCR 技术构建双孢蘑菇的分子标记以来,RAPD、AFLP、ISSR、SCAR 等分子标记技

术被相继应用于双孢蘑菇^[12-14]、香菇^[15-17]、草菇^[18-19]、金针菇^[20]、银耳^[21]、黑木耳^[22-23]等领域的研究中,在食用菌的遗传育种、菌种和菌株鉴定、遗传多样性分析、基因定位和克隆等方面发挥了巨大作用,极大地提升了食用菌的基础和应用研究水平,为这一领域研究的深入和拓展展现了光明的前景。

SRAP (Sequence related amplified polymorphism) 技术是通过独特的引物设计对开放阅读框进行扩增,检测简单,重复性好,具有较高的多态性水平,能够比较容易地分离目的标记并测序,并且无需事先了解基因组序列信息,具有操作简便、快速、仅需微量 DNA 等特点,因而被广泛应用于遗传多样性研究^[24-25]和种质资源的鉴定^[26]。Paran 等^[27]发明了序列特征性扩增区域 (Sequence-characterized amplification region, SCAR) 分子标记技术,它最初是从 RAPD 分子标记技术衍生而来,对于依靠 AFLP 以及 SRAP 等技术获得的多态性片段也可应用。与 SRAP 相比,SCAR 标记无需在样品鉴定时筛选大量的引物,特异性更强,一般表现为扩增片段的有无,适用于大量个体的快速检测,在实际应用中,具有快速、简便和低成本的优越性。但至今尚未见到将 SRAP 和 SCAR 分子标记技术应用于草菇菌种退化研究方面的报道。本研究拟以现有的菌丝退化草菇菌株与其菌丝正常菌株为试验材料,采用群体分离分析法 (Bulked segregation analysis, BAS)^[28]开展草菇菌种退化的 SRAP 分子标记研究,对所获得的基因片段进行分析验证,从中筛选出与退化性状基因紧密连锁的分子标记,以期为进一步研究目标性状基因的克隆与功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 草菇 V51 正常菌株(对照)及其菌

丝退化菌株 VNM1~10,为华南农业大学食品学院生物炼制实验室保存。

1.1.2 引物 SRAP 引物设计、筛选参考 Li

等^[29]的方法,从其所用引物中随机选取 9 个上游引物和 9 个下游引物组合,共 81 对引物(表 1)。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表 1 本研究中所用的 SRAP 引物组合

Table 1 SRAP primer pairs in this study

上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
Me1;5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	Em1;5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
Me2;5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	Em2;5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
Me3;5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	Em3;5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
Me4;5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	Em4;5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
Me5;5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	Em5;5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
Me6;5'-TGAGTCCAAACCGGTAG-3'	Em6;5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
Me7;5'-TGAGTCCAAACCGGTTG-3'	Em7;5'-GACTGCGTACGAATTATG-3'
Me8;5'-TGAGTCCAAACCGGTGT-3'	Em8;5'-GACTGCGTACGAATTAGC-3'
Me9;5'-TGAGTCCAAACCGGTCA-3'	Em9;5'-GACTGCGTACGAATTACG-3'

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和 DNA 池的构建 将草菇正常菌株及其菌丝退化菌株母种从试管接种到 PDA 固体培养基上,于 32 ℃ 恒温培养 3~5 d,待菌丝长满平板,保证足够量的菌丝用于基因组 DNA 提取。草菇基因组 DNA 的提取按照王艺红等^[30]的 FDEB 法。参照 Altinkut 等^[28]的群体分离分析方法,取对照菌株 V51 200 μL 基因组 DNA,构建 DNA 池 1;取 VNM1~10 基因组 DNA 各 20 μL 等量混合,构建 DNA 池 2,用于筛选特异性标记。

1.2.2 SRAP-PCR 反应体系及扩增程序 25 μL SRAP-PCR 反应体系中,含 dNTP(10 mmol/L)0.5 μL,基因组 DNA (50 ng/μL)1.0 μL,上游引物(10 μmol/L)1.5 μL,下游引物(10 μmol/L)1.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μL)0.5 μL,10×PCR buffer(含 20 mmol/L Mg²⁺)2.5 μL,其余为双蒸水。PCR 扩增程序为:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 1 min,50 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 50 s,32 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB)电泳分离,电泳后经电泳凝胶成像系统(BIO-RAD 公司)成像检测。

1.2.3 差异片段克隆及序列测定 参照 DNA 纯化回收试剂盒(TIANGEN 公司)说明书回收 PCR 产物差异片段。将回收产物与 pMD18-T 载体连接,构建重组质粒,重组质粒命名为 pMD-VNMDF,将其转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,筛选的阳性克隆送至上海美吉生物医药科技有限公司测序。测序结果在 GenBank 中进行 BLASTN 和 BLASTX 搜索并进行分析。

1.2.4 SRAP 标记转化为 SCAR 标记 SRAP 分

子标记虽具有较高的多态性水平,但是特异性较差,限制了其实际生产应用。而 SCAR 标记特异性更强,更为实用。因此,本研究根据获得的 SRAP 差异片段序列,用软件 Primer 5.0 设计 SCAR 特异引物。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。用设计的 SCAR 特异引物对草菇正常菌株 V51 及其菌丝退化菌株进行扩增,确认建立的 SCAR 标记的真实性和可靠性。PCR 反应的退火温度调整为 58 ℃,其他同 SRAP-PCR 一致。

2 结果与分析

2.1 草菇基因组 DNA 的提取

提取菌丝生长退化草菇菌株 VNM 以及对照草菇菌株 V51(图 1)的基因组 DNA,凝胶电泳检测结果表明,DNA 纯度较高,结构完整,带型整齐一致,无明显降解现象(图 2),因此可以用于进一步构建 DNA 池和 SRAP 分析。

2.2 草菇 SRAP 标记的筛选

用 81 对 SRAP 引物组合对菌丝退化草菇菌株 VNM 和菌丝正常对照菌株 V51 的基因组 DNA 进行扩增,发现大部分引物组合都有扩增条带,片段长度在 50~2 000 bp,平均每对引物组合可扩增出约 25 条清晰的条带(图 3)。大部分引物组合在 2 种菌株间扩增图谱相同。经 3 次重复后,有 2 对引物在 2 种菌株基因组 DNA 间存在稳定的差异,分别是 Me8-Em2、Me8-Em4,扩增除了明显的差异条带,其中仅 Me8-Em4 在菌丝退化菌株中多出 1 条特异条带,大小约为 300 bp(图 4),经多次重复验证,该差异条带表现稳定。

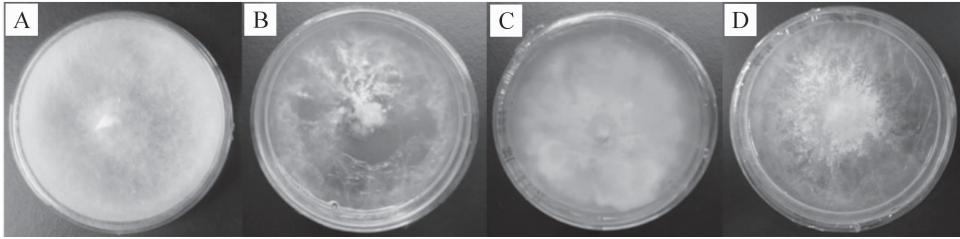


图 1 菌丝出现退化的代表性草菇菌株
A. 对照菌株 V51; B,C,D. 部分菌丝退化菌株 VNM

Fig. 1 Degeneration characters of hyphae of *Volvariella volvacea* strains
A is CK(V51); B,C,D are the hyphae degeneration strains VNM

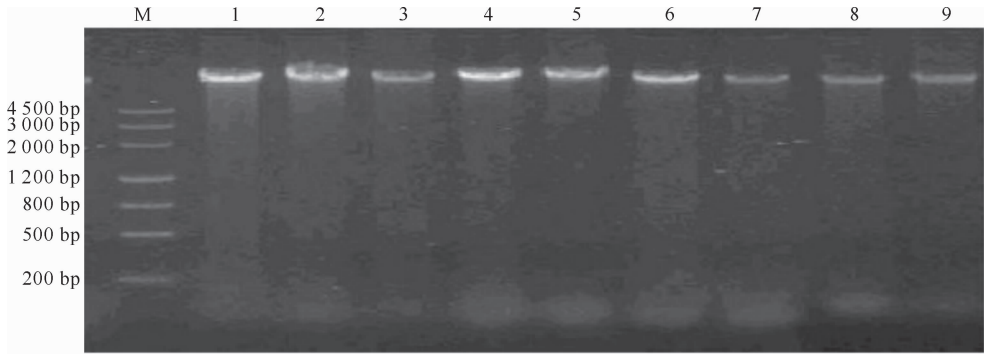


图 2 草菇菌株基因组 DNA 的电泳检测结果(部分结果)
M. Marker 3; 1. V51; 2~9. VNM1~8

Fig. 2 Agarose gel analysis of genomic DNA (part) of *Volvariella volvacea* strains
M. Marker 3; 1. V51; 2~9. VNM1~8

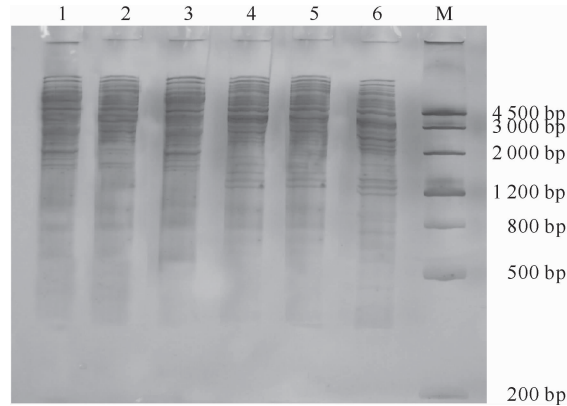


图 3 基于 81 对 SRAP 引物的草菇基因组
PCR 扩增结果(部分结果)
M. Marker 3; 1. V51; 2~6. VNM

Fig. 3 PCR amplification product of SRAP (part) of *Volvariella volvacea* strains
M. Marker 3; 1. V51; 2~6. VNM

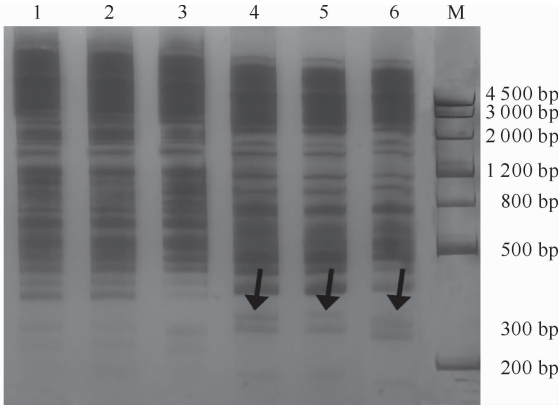


图 4 基于引物对 Me8-Em4 的草菇基因组 PCR
扩增产物电泳结果
M. Marker 3; 1~3. V51; 4~6. VNM; 箭头示差异条带

Fig. 4 PCR amplification products of primer pairs
Me8-Em4 of *Volvariella volvacea* strains

M. Marker 3; 1~3. V51; 4~6. VNM; Arrows indicate different bands
片段长度为 279 bp, 将其命名为 VNMDP。在 GenBank 中进行 BLASTN 搜索, 结果显示, 所得序列与 *Moniliophthora roreri* MCA 2997 26S 蛋白酶体亚基 ATPase 3 部分 mRNA 序列(GenBank 登录号为 XM_007846773.1) 的相似性为 81%, E 期望值都为

2.3 草菇退化相关差异片段的克隆及测序

将扩增得到的差异片段与 pMD18-T 载体连接, 构建重组质粒 pMD-VNMDP 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选的阳性克隆委托上海美吉生物医药科技有限公司测序。测序结果(图 5)显示, 所得

2×10^{-25} ;BLASTX 搜索结果显示,所得序列与禾柄锈菌(*Puccinia graminis*)26S 蛋白酶调节亚基 6A 的氨基酸序列 (GenBank 登录号为 XP_003329145.1) 和 污 叉 丝 孔 菌 (*Dichomitus*

squalens) 26S 蛋白酶体亚基 P45 的氨基酸序列 (GenBank 登录号为 XP_007366306.1) 相似性都为 93%,E 期望值都为 4×10^{-28} 。由此推测,VNMDF 很可能与编码 26S 蛋白酶体亚基相关。

TGAGTC**CAAACCGGACCGGAGGAGGG**CAGGATCCAAATATCTATACGATTAGTGCGCGCGATG
ACCTAGGCGAGATTGATCAGCCAAAGGGGAGAACAAAGGAGGAAGGACGTGGTAATACCTTAATTCCA
TCATCACTGCTGAAACCGTCTAATTGATTAGTAGTTCCAAATCGTGCGCTGCACCTTCTCAATCACCAC
TCTTCTCCGAATCGAATCGCTTAGTACCAATGGC**ATCCAGCTCATCAATGAAGATAAT**TGCAGGGGCC
TTCTCCTTGGCTAATTCGTACCGAGTC

图 5 草菇特异遗传标记 VNMDf 的序列
下划线处为 SCAR250 引物对序列

Fig. 5 Nucleotide sequence of the specific genetic marker VNMDf of *Volvariella volvacea* strains
Underlined is sequence of SCAR250 primer

2.4 草菇 SCAR 标记的筛选

根据 SRAP 扩增的特异片段 VNMDf 的测序结果(GenBank 登录号:KJ935906),设计 SCAR 特异引物对 SCAR250 (SCAR250-F: 5'-CAAACCGGACCGGAGGAGGG-3',SCAR250-R:5'-TCTTC-ATTGATGAGCTGGAT-3'),对草菇菌丝退化菌株与对照菌株基因池进行扩增,结果在菌丝退化草菇菌株基因池中扩增出长度约为 250 bp 的单一

条带,而在对照菌株基因池中未扩增出条带。对 8 个菌丝退化菌株与 4 个对照菌株进行扩增检测,结果显示,该引物对在草菇菌丝退化单株中扩增出 1 条稳定的特异条带,长度大约为 250 bp,与预期片段大小(279 bp)一致,而对照菌株中均未扩增出相应的条带(图 6),表明已成功将该 SRAP 标记转化为 SCAR 标记,将其命名为 SCAR250。由于 SCAR 标记在退化菌株中的特异性,推测获得的 SCAR 标记可能与草菇菌丝生长退化性状连锁。

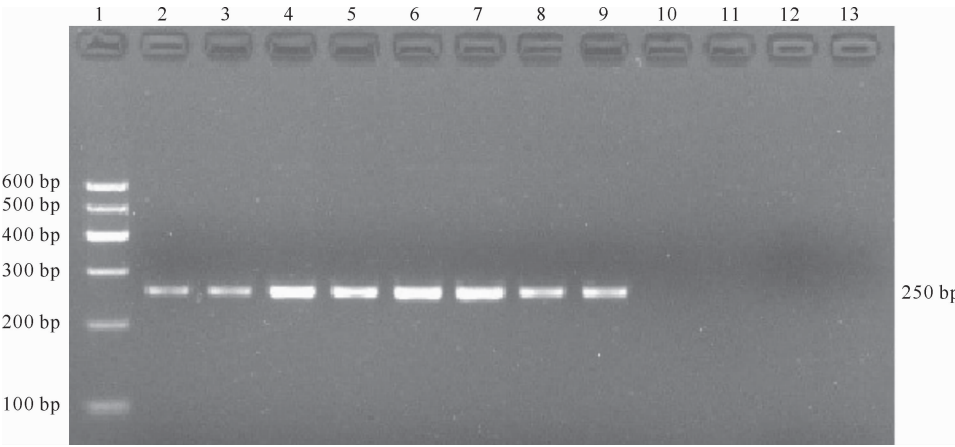


图 6 引物标记 SCAR250 在草菇 8 个菌丝退化菌株和 4 个对照菌株中的扩增结果
1. Marker 1;2~9. 菌丝退化菌株 VNM;10~13. 对照菌株(V51)

Fig. 6 Amplification of primer SCAR250 for 8 degenerative strains and 4 CKs of *Volvariella volvacea*
1. Marker 1;2-9. Degenerative strains VNM;10-13. CK (V51)

3 讨论与结论

在草菇的生产实践中,菌种退化是制约其产业化开发的一大瓶颈。食用菌菌种退化的本质是遗传变异^[3]。草菇菌丝属初级同宗结合真菌,单孢可孕,菌丝细胞多核。群体分离分析法(Bulked segrega-

tion analysis,BSA)是 1991 年由 Michelmores 等^[31]提出的。本研究在构建基因组 DNA 混合池时,选择的草菇菌株(对照菌株 V51 和菌丝退化菌株 VNM1~10)不但目的性状表现明显,且其他性状基本一致,这样既有利于筛选到与菌丝退化草菇性状相关的 DNA 差异,又可以节省时间,减少工作量。

本研究在对草菇菌丝退化菌株与对照菌株基因池进行的 PCR 扩增中发现,标记 SCAR250 仅在菌丝退化菌株基因池中有扩增片段,对照菌株基因池中无扩增片段,表明 SCAR250 标记可能是菌丝退化草菇菌株的特异标记;随后进行了草菇 8 个菌丝退化单株与 4 个对照单株的验证,结果所有草菇菌丝退化单株都存在 SCAR250 标记,而 4 个对照单株均无此标记,此扩增结果进一步证实了上述观点。片段 VNMDF 是通过 SRAP 引物对 Me8-Em4 扩增而获得的,特异性很差,检测不便,因此在此基础上开发了 SCAR 标记 SCAR250。SCAR 标记十分稳定,在应用上具有迅速、简便、低成本的特点^[18]。SCAR250 标记只需对简单提取的草菇总 DNA 进行 PCR 操作,即可在几小时内鉴定草菇菌株的类型。

进一步对得到的标记片段 VNMDF 进行序列分析发现,该标记与 26S 蛋白酶体亚基的核酸序列和氨基酸序列相似性较高,分别为 81% 和 93%。泛素/26S 蛋白酶体系统(Ubiquitin-26S proteasome system,UPS)是细胞内重要的蛋白质降解系统^[32]。它主要由泛素激活酶、泛素结合酶、泛素蛋白连接酶和 26S 蛋白酶体组成^[33]。它通过调节功能蛋白质的周转(Turn over)或降解不正常蛋白,实现对多种代谢过程的调节。因此,推测草菇菌丝生长退化菌株可能是由于编码 26S 蛋白酶体亚基的 DNA 序列发生突变引起的。

本试验通过 SRAP 技术,对草菇正常菌株 V51 与其菌丝退化菌株 VNM 的基因组 DNA 进行分析,结果筛选到 1 条存在于菌丝退化菌株中,且与草菇菌丝退化可能有重大关联的 SRAP 标记,并成功将其转化成 SCAR 标记,该标记序列与 26S 蛋白酶体亚基的核酸序列和氨基酸序列有着很高的相似性,但对于该标记影响草菇菌丝退化的具体机制,仍需进一步研究。

[参考文献]

[1] 鲍大鹏,赵国屏,谭琦,等.草菇全基因组框架图[J].食用菌学报,2010(1):1-2.
Bao D P,Zhao G P,Tan Q,et al. Draft sequence of the *Volvariella volvacea* genome [J]. Acta Edulis Fungi,2010(1):1-2. (in Chinese)

[2] 杨维丽,敖莉,李长田,等.草菇菌株的生物学特性比较[J].食用菌学报,2011(4):19-21.
Yang W L,Ao L,Li C T,et al. Comparison of selected biological characteristics of twenty five *Volvariella volvacea* cultivars

grown on cotton waste [J]. Acta Edulis Fungi,2011(4):19-21. (in Chinese)

[3] 刘新宇,祁玉良,熊在东,等.食用菌菌种退化的遗传学分析[J].信阳农业高等专科学校学报,2001(2):16-18.
Liu X Y,Qi Y L,Xiong Z D,et al. Study on degeneration of the species of edible mushrooms [J]. Journal of Xinyang Agricultural College,2001(2):16-18. (in Chinese)

[4] Magae Y,Hayashi N. Double-stranded RNA and virus-like particles in the edible basidiomycete *Flammulina velutipes* (Enokitake) [J]. FEMS Microbiology Letters,1999,180(2):331-335.

[5] 丁湖广.菌种退化与老化原因及防止措施[J].特种经济动植物,2006(1):39-40.
Ding H G. Degeneration and aging causes of the strains and prevention measures [J]. Special Economic Animal and Plant,2006(1):39-40. (in Chinese)

[6] 王志强.草菇菌种的提纯复壮初探[J].食用菌,2009(6):28-29.
Wang Z Q. Preliminary study on purification and rejuvenation of *Volvariella volvacea* strains [J]. Edible Fungi,2009(6):28-29. (in Chinese)

[7] 曹裕汉.草菇有性分离选育种研究[J].食用菌,2003(2):12-13.
Cao Y H. Breeding research of straw mushroom(*Volvariella volvacea*) by sexual separation selection [J]. Edible Fungi,2003(2):12-13. (in Chinese)

[8] 刘海英,董月香,周延斌,等.食用菌菌种的退化及复壮[J].食用菌,2003(6):16-17.
Liu H Y,Dong Y X,Zhou T B,et al. Degeneration of edible fungi strains and rejuvenation [J]. Edible Fungi,2003(6):16-17. (in Chinese)

[9] Li A,Begin M,Kokurewicz C,et al. Inheritance of strain instability (sectoring) in the commercial button mushroom,*Agaricus bisporus* [J]. Appl Environ Microbiol,1994,60(7):2384-2388.

[10] 李美娜,吴谢军,李春燕,等.人工栽培蛹虫草退化现象的分子分析[J].菌物系统,2003,22(2):277-282.
Li M N,Wu X J,Li C Y,et al. Molecular analysis of degeneration of artificial planted *Cordyceps militaris* [J]. Mycosystema,2003,22(2):277-282. (in Chinese)

[11] Khush R S,Becker E,Wach M. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* [J]. Applied and Environmental Microbiology,1992,58(9):2971-2977.

[12] Chauhan S,Kapoor S,Thakur S K. RAPD marker assisted development of improved strains of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing [J]. Journal of Pure and Applied Microbiology,2012,6(4):1841-1848.

[13] Mahmudul I N,Bian Y. Efficiency of RAPD and ISSR markers in differentiation of homo-and heterokaryotic protoclones of *Agaricus bisporus*. [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology,2010,20(4):683-692.

- [14] Foulongne-Oriol M, Spataro C, Cathalot V, et al. An expanded genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus* × *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid based on AFLP, SSR and CAPS markers sheds light on the recombination behaviour of the species [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(3): 226-236.
- [15] 刘靖宇, 宋秀高, 叶 夏, 等. 香菇菌株遗传多样性 ISSR、RAPD 和 SRAP 综合分析 [J]. *食用菌学报*, 2011(3): 1-8.
Liu J Y, Song X G, Ye X, et al. Differentiation of *Lentinula edodes* strains using ISSR, RAPD and SRAP markers [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2011(3): 1-8. (in Chinese)
- [16] Mukhopadhyay K, Haque I, Bandopadhyay R, et al. AFLP based assessment of genetic relationships among shiitake (*Lentinula* ssp.) mushrooms [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(5): 6059-6065.
- [17] Liu J, Ying Z, Liu F, et al. Evaluation of the use of SCAR markers for screening genetic diversity of *Lentinula edodes* strains [J]. *Current Microbiology*, 2012, 64(4): 317-325.
- [18] 傅俊生, 刘新锐, 谢宝贵, 等. 草菇 SCAR 遗传标记建立及其杂种鉴定应用 [J]. *中国农学通报*, 2010(17): 41-46.
Fu J S, Liu X R, Xie B G, et al. Establishment of SCAR genetic marker on *Volvariella volvacea* and its application of hybrid identification [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010(17): 41-46. (in Chinese)
- [19] Ahlawat O P, Gupta P, Kamal S, et al. Development of molecular and biochemical markers for selecting a potential high yielding strain of paddy straw mushroom (*Volvariella volvacea*) [J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 17(1): 57-63.
- [20] 陆 欢, 章炉军, 张 丹, 等. 中国金针菇工厂化生产用种 SSR 和 AFLP 遗传多样性分析 [J]. *中国农学通报*, 2014(19): 92-97.
Lu H, Zhang L J, Zhang D, et al. Genetic diversity analysis of industry-cultivated *Flammulina velutipes* in China using SSR and AFLP markers [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014(19): 92-97. (in Chinese)
- [21] 温文婷, 贾定洪, 郭 勇, 等. 中国主栽银耳配对抗灰菌的系统发育和遗传多样性 [J]. *中国农业科学*, 2010(3): 552-558.
Wen W T, Jia D H, Guo Y, et al. Phylogeny and genetic diversity of *Annulohypoxylon* spp. paired with cultivated *Tremella fuciformis* Berk [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010(3): 552-558. (in Chinese)
- [22] Du P, Cui B K, Dai Y C. Genetic diversity of wild *Auricularia polytricha* in Yunnan Province of South-western China revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) analysis [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(8): 1374-1381.
- [23] Du P, Cui B K, Zhang C F, et al. Genetic diversity of wild *Auricularia auricula-judae* revealed by ISSR analysis [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, 48: 199-205.
- [24] Youssef M, James A C, Rivera-Madrid R, et al. Musa genetic diversity revealed by SRAP and AFLP [J]. *Molecular Biotechnology*, 2011, 47(3): 189-199.
- [25] Cai X, Feng Z, Zhang X, et al. Genetic diversity and population structure of an endangered Orchid (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) from China revealed by SRAP markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 129(4): 877-881.
- [26] Moustafa K A, Saleh M, Al-Doss A A, et al. Identification of TRAP and SRAP markers linked with yield components under drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Omics*, 2014, 7(4): 253-259.
- [27] Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in *Lettuce* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 85(8): 985-993.
- [28] Altinkut A, Gozukirmizi N. Search for microsatellite markers associated with water-stress tolerance in wheat through bulked segregant analysis [J]. *Molecular Biotechnology*, 2003, 23(2): 97-106.
- [29] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103(2/3): 455-461.
- [30] 王艺红, 林俊芳, 张炜阳, 等. 食用菌 DNA 提取方法研究 [J]. *食用菌*, 2008(3): 18-20.
Wang Y H, Lin J F, Zhang W Y, et al. Study on DNA extraction methods of edible fungi [J]. *Edible Fungi*, 2008(3): 18-20. (in Chinese)
- [31] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(21): 9828-9832.
- [32] 王国坤, 田风霞, 宫江峰, 等. 泛素/26S 蛋白酶体系统介导的细胞程序化死亡 [J]. *生命科学*, 2011(1): 26-31.
Wang G K, Tian F X, Gong J F, et al. Programmed cell death mediated by ubiquitin-26S proteasome system [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011(1): 26-31. (in Chinese)
- [33] 黄海杰, 陈雄庭. 植物泛素/26S 蛋白酶体途径研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2008(7): 127-132.
Huang H J, Chen X T. The progress on the ubiquitin 26S proteasome pathway in plants [J]. *China Biotechnology*, 2008(7): 127-132. (in Chinese)