



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116334298 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 19

(21) 申请号 202310580425.3

(22) 申请日 2023.05.23

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 116334298 A

(43) 申请公布日 2023.06.27

(73) 专利权人 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 刘伟 时晓菲 杨振艳 于富强

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 高辉

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 109628625 A, 2019.04.16

CN 114250152 A, 2022.03.29

CN 115927728 A, 2023.04.07

刘伟等.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》.第38卷(第12期),第2195-2204页.

马杰等.基于转录组序列的羊肚菌EST-SSR 标记开发与遗传多样性分析.《江苏农业学报》.2020,第36卷(第5期),第1282-1290页.

Xi-Hui Du等.Hybridization, characterization and transferability of SSRs in the genus Morchella.《Fungal Biol》.2019,第123卷(第7期),第528-538页.

孟清;谢占玲;戴大日;王晓芳;陈薇;薛治峰;唐佳斌.青海小海绵羊肚菌M12-10转录组SSR 信息分析及其分子标记开发.青海大学学报 .2019,(06),第1-10页.

杨燕;田鸿;张小平;毋校辉;罗金洲.基于 ITS和ISSR的羊肚菌种质资源遗传多样性分析.西南农业学报.2018,(10),第2004-2009页.

审查员 梁欢

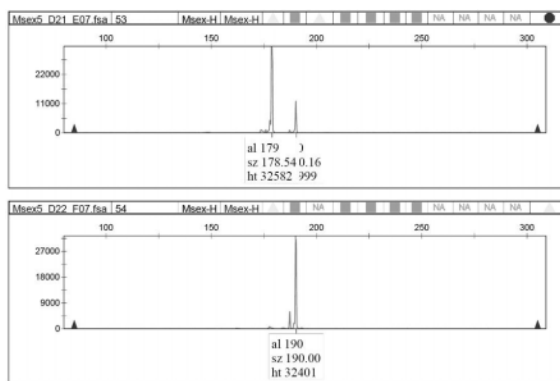
权利要求书1页 说明书15页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种六妹羊肚菌SSR分子标记、引物组及其应用

(57) 摘要

本发明属于食用菌遗传学分析及育种技术领域,具体涉及一种六妹羊肚菌SSR分子标记、引物组及其应用。本发明所述六妹羊肚菌SSR分子标记包括37个SSR分子标记中的一种或多种;所述37个SSR分子标记通过7个六妹羊肚菌基因组的全基因组水平的比较分析得到;所述37个SSR分子标记的核苷酸序列如SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.37所示。本发明所述37个SSR分子标记在20份六妹羊肚菌中表现出较高的多态性,且稳定性好,可以用于六妹羊肚菌的遗传多样性分析和种质鉴定,具有较好地应用价值。



1. 一种六妹羊肚菌SSR分子标记,其特征在于,所述六妹羊肚菌SSR分子标记由以下37个SSR分子标记组成:Msex_82、Msex_713、Msex_709、Msex_692、Msex_658、Msex_650、Msex_621、Msex_620、Msex_615、Msex_576、Msex_558、Msex_553、Msex_548、Msex_546、Msex_54、Msex_523、Msex_519、Msex_5、Msex_491、Msex_49、Msex_455、Msex_426、Msex_367、Msex_332、Msex_279、Msex_247、Msex_246、Msex_235、Msex_213、Msex_209、Msex_194、Msex_193、Msex_177、Msex_173、Msex_159、Msex_116和Msex_10;

所述37个SSR分子标记的引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.38~SEQ ID NO.111所示。

2. 权利要求1所述的六妹羊肚菌SSR分子标记在六妹羊肚菌的遗传学分析、育种和种质鉴定中的一种或多种中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述遗传学分析包括遗传多样性分析、群体遗传结构分析、基因流分析、聚类分析和构建分子指纹图谱中的一种或多种。

4. 一种用于六妹羊肚菌遗传学分析的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1所述37个SSR分子标记的引物对和PCR扩增试剂。

5. 一种六妹羊肚菌的遗传学分析方法,其特征在于,包括如下步骤:

以权利要求4所述的引物对对六妹羊肚菌基因组DNA进行PCR扩增,得到扩增产物;

将所述扩增产物进行电泳检测,得到多态性扩增条带;

对所述多态性扩增条带进行遗传学分析。

6. 根据权利要求5所述的遗传学分析方法,其特征在于,所述遗传学分析包括遗传多样性分析、群体遗传结构分析、基因流分析和聚类分析。

7. 根据权利要求6所述的遗传学分析方法,其特征在于,所述遗传多样性分析包括:计算各SSR分子标记位点的等位基因、有效等位基因、私有等位基因和香农指数中的一种或多种。

一种六妹羊肚菌SSR分子标记、引物组及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于食用菌遗传学分析及育种技术领域,具体涉及一种六妹羊肚菌SSR分子标记、引物组及其应用。

背景技术

[0002] 羊肚菌是一种名贵的珍稀食用菌,不但味道鲜美、口感脆嫩,还富含多种生物活性成分,具有抗癌、抗肿瘤、抗疲劳、提高免疫力和保肝护肝等功效,深受人类的青睐。据统计,2021-2022年度,全国的羊肚菌栽培面积已达25万亩,是十年前的80余倍,栽培区域也遍布全国各地。然而由于羊肚菌菌种的不稳定性导致的70%的种植户无法稳定盈利。

[0003] 六妹羊肚菌是目前大面积推行的羊肚菌栽培品种之一,具有抗温差波动能力强,适应性广和产量稳定的优势,近年来在全国各地推广较多。然而,由于前端的遗传育种研究基础薄弱,品种选育工作难以推进,且市场上品种的肆意传代导致的活力退化现象也常有发生,如相同的菌株在各地表现差异明显,甚至出现一些区域高产,一些区域绝收的极端案例。该现象的内因是品种权的保护问题,如何保障育种工作者的权益成为行业亟待解决的事情。

[0004] 分子身份标签是通过DNA条形码技术,为每一个菌株构建一套独有的分子标记信息,以区分异己,实现菌种保护的目。SSR(Simple Sequence Repeats)分子标记是行业内认可度较高的分子标记技术,其是基于基因组中的1-6个核苷酸的重复片段多态性设计,具有序列变异度高、稳定性高、共显性等优势,已在动物、植物和微生物中广泛使用,同时,SSR分子标记也广泛用于遗传图谱的构建、目标基因的标定、指纹图的绘制、品种鉴定、谱系分析、群体间遗传距离分析、进化和遗传多样性等研究中。

[0005] 传统的SSR标记开发借助常规的重复序列富集PCR扩增、ISSR(inter-simple sequence repeat)转化、EST-SSR(expressed sequence tag-simple sequence repeat)序列开发以及简单的依靠单一的基因组序列查找SSR位点进行开发检测。刘伟等(2018)曾基于粗柄羊肚菌的转录组数据分析了其SSR分布和序列特征分析(刘伟等.粗柄羊肚菌转录组的SSR分布和序列特征分析.轻工学报,2017,32(02):33-39)。孟清等(2019)同样基于小海绵羊肚菌转录组数据进行SSR信息分析和分子标记的开发,其中随机筛选的12对SSR引物中4对引物表现稳定可重复的多态性,并对收集的19株羊肚菌进行了遗传多样性分析(孟清等.青海小海绵羊肚菌M12-10转录组SSR信息分析及其分子标记开发.青海大学学报,2019,37(06):1-10)。Du et al.(2019)基于一个梯棱羊肚菌基因组数据的SSR特征分析,设计了一套适用于*M. importuna*,*M. sextelata*,*M. eximia*,*M. exuberans*,*Mel-13*和*Mel-21*的SSR分子标记,但该标记的多态性较低,22个SSR标记在6个种中只扩增得到了15-22个多态性位点(Du et al. Hybridization, characterization and transferability of SSRs in the genus *Morchella*. Fungal Biology. 2019,123(7):528-538)。目前上述现有技术中针对梯棱羊肚菌、粗柄羊肚菌或小海绵羊肚菌开发的SSR标记的种间通用性较差,引物多态性较低,无法用于六妹羊肚菌的鉴定及遗传多样性的分析。

发明内容

[0006] 本发明的目的通过7个六妹羊肚菌基因组比较分析,获得一套六妹羊肚菌SSR分子标记、引物组及其应用,所述SSR分子标记多态性高,可以用于六妹羊肚菌的特异性遗传多样性分析。

[0007] 本发明提供了一种六妹羊肚菌SSR分子标记,所述的六妹羊肚菌SSR标记位点通过7个六妹羊肚菌基因组的比较分析得到;所述六妹羊肚菌SSR分子标记包括以下37个SSR分子标记中的一种或多种:Msex_82、Msex_713、Msex_709、Msex_692、Msex_658、Msex_650、Msex_621、Msex_620、Msex_615、Msex_576、Msex_558、Msex_553、Msex_548、Msex_546、Msex_54、Msex_523、Msex_519、Msex_5、Msex_491、Msex_49、Msex_455、Msex_426、Msex_367、Msex_332、Msex_279、Msex_247、Msex_246、Msex_235、Msex_213、Msex_209、Msex_194、Msex_193、Msex_177、Msex_173、Msex_159、Msex_116和Msex_10;

[0008] 所述37个SSR分子标记的核苷酸序列分别如SEQ ID NO .1~SEQ ID NO .37所示。

[0009] 优选的,所述六妹羊肚菌SSR多态性位点通过7个六妹羊肚菌全基因组水平的比较分析得到。

[0010] 优选的,所述六妹羊肚菌SSR分子标记包括37个SSR分子标记。

[0011] 本发明还提供了用于扩增上述技术方案所述六妹羊肚菌SSR分子标记的引物组,所述引物组包括所述37个SSR分子标记的引物对,所述37个SSR分子标记的引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.38~SEQ ID NO.111所示。

[0012] 本发明还提供了上述技术方案所述的六妹羊肚菌SSR分子标记或上述技术方案所述的引物组在六妹羊肚菌的遗传学分析、育种和种质鉴定中的一种或多种中的应用。

[0013] 优选的,所述遗传学分析包括遗传多样性分析、群体遗传结构分析、基因流分析、聚类分析和构建分子指纹图谱中的一种或多种。

[0014] 本发明还提供了一种用于六妹羊肚菌遗传学分析的试剂盒,所述试剂盒包括上述技术方案所述的引物组和PCR扩增试剂。

[0015] 本发明还提供了一种六妹羊肚菌的遗传学分析方法,包括如下步骤:

[0016] 以上述技术方案所述的引物组对六妹羊肚菌基因组DNA进行PCR扩增,得到扩增产物;

[0017] 将所述扩增产物进行电泳检测,得到多态性扩增条带;

[0018] 对所述多态性扩增条带进行遗传学分析。

[0019] 优选的,所述遗传学分析包括遗传多样性分析、群体遗传结构分析、基因流分析和聚类分析。

[0020] 优选的,所述遗传多样性分析包括:计算各SSR分子标记位点的等位基因、有效等位基因、私有等位基因和香农指数中的一种或多种。

[0021] 有益效果:

[0022] 本发明提供了一种六妹羊肚菌SSR分子标记,所述六妹羊肚菌SSR分子标记包括以下37个SSR分子标记中的一种或多种:Msex_82、Msex_713、Msex_709、Msex_692、Msex_658、Msex_650、Msex_621、Msex_620、Msex_615、Msex_576、Msex_558、Msex_553、Msex_548、Msex_546、Msex_54、Msex_523、Msex_519、Msex_5、Msex_491、Msex_49、Msex_455、Msex_426、Msex_367、Msex_332、Msex_279、Msex_247、Msex_246、Msex_235、Msex_213、Msex_209、Msex_194、Msex_193、Msex_177、Msex_173、Msex_159、Msex_116和Msex_10;所述37个SSR分子标记的核

- [0060] AGATGGGCAGCAGATCAACAATCAAGAGGAGTCAATTGAGATGAATGTAGGTACGAGCAGCTTAATGA
TTTCGACACCAATGGCGAAGAGAGAGATGTATTGTAGAGAGAGAGAGAAAAGAGAGAGCTCAATGGTCAACAGAG
ATCAATGGACGGAAGAGAGGGTCA;
- [0061] SEQ ID NO.16:Msex_523|GGT|6
- [0062] TGGTATACGGGAAGGTGGGTGGGTGGTGGTGGTGGTTGGCTCCCGCAGGGGAGTGCAGAATATT
ACGTTTATCCAGCGTCGTGGGAGTGTGAAAAGAAGAAAGTGATGACAACGATGGTGGTGTGG;
- [0063] SEQ ID NO.17:Msex_519|GGT|5
- [0064] TGAGGAGAGGAGGAGGTGGAGGTGGTGGTGGTGGTAGAGCTAGGAGGAGGAGGTGGTGGAGTGGAGGA
GAATGTAGGAAGAGTGTTAATAACGCACCTCGGGAGAAGAGGCTAGCCAGTTAGAAGAGCTGTGTGATGAGCTAA
ACAAGATAGTAGAGTCGAGAGCAAGACACAGACTCACGACACACGA;
- [0065] SEQ ID NO.18:Msex_5|AAC|7
- [0066] ATTTTCGAGGACGGTGAGGTGCAGTTGTCGAGGGGCATGAGCCAGATGTCTGGTCCGCAAGCTCGAGT
TAGCAGGTGGTCCAATAATGAATATATAGCTCCAGCTAGCTATCCCAACAATAACAACAACAACAACAACGA
AAGAGCTACAAACCCGAGCAC;
- [0067] SEQ ID NO.19:Msex_491|GGA|8
- [0068] GGGCTCCAGAACCTGTTCTCGTTCCAGGAGAACCATCCTGAAGGAGATTGTCAATAAGACGAATGT
GGCCGAGTCAAGGGCGGGGTTCGGTGGCGGGGTGGAGCTGGGCGGGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TTTGGAGAGGATGTGGATGGCATGAATGCGTTGAATCAGTTGGCG;
- [0069] SEQ ID NO.20:Msex_49|AG|13
- [0070] ATCATTCCATGGCGGGTGTCTGATCATCTTCGAGAAGTTGGGTCTGGGGACGTCCGTGGGGGCGT
AGATTACCACTAGCTCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGAGAGAGAGGTGCACGGTAGGTACCGTGCGAGT
CTGCAATTACTATACTCCATAGCTAGCTAGAGCAGTAGTGGGCT;
- [0071] SEQ ID NO.21:Msex_455|GCACCA|7
- [0072] GTGAAGTGGGCATCATTCGCCCTCCTGCGCTCCCCGGCCAGCAGCAGGTCCTCGTCCTGCTCCTGCAC
GGTCGCGGCGGACGAGGACGCACCAGCACCAGCACCAGCACCAGCACCAGCACCAGCACCAGCACCAGCGGGGCCAGCAGCG
CGGGGGCAAAGGCTTGACGGCAAACACGGTGTGCTTGTTCGAGGTCGTCCT;
- [0073] SEQ ID NO.22:Msex_426|GAG|6
- [0074] GCACCAAGCAGCAGGATAGTGTGTCGTAAGCAGAGCCGGAGGATGAAGGCGTTGTTGTCATCAAA
GACGAACCAGAAGAAGAGACCACAGGACTAAAAGAAGAGAGCTCCGATGAAGAAGAAGAAGAGGAGGAGGAGG
AGCACAAGGAAGAAGAGAGCGACGC;
- [0075] SEQ ID NO.23:Msex_367|CTG|5
- [0076] CTGTTGTTGCGCTTGGAGTGGGCTTGTGTTGCTGCTGCTGCTGGAGTGGGCTTGGCTGCTGGGTGA
ATTGCTGTTGCTGGAGGAATTGTTGCTGTTGCTGTTGCTGCTGCTGTATTAGCATTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTGCTGCTGTTGTTGTTGGGCTTGGTGGTATGGGTTGT;
- [0077] SEQ ID NO.24:Msex_332|CT|16
- [0078] TGCTGCTTACCTCTACACGAAAGTCCCTCACAGCTCTAGAAGGTATCATCATCAATCACTAGACGAAA
GCAAACACTCACCTTTCCTGAATCACACACACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTACTCTTTAC
TTGCACACTCACAGTACCCA;
- [0079] SEQ ID NO.25:Msex_279|CCGG|6

[0080] GGCCCTAAGTTGCTGTGGATTACCTCAATTAGCTTGATTAGCCCCAGCATTACCTGCTGGAGGATTAG
CTTGATTAGCCCCAGCATTACCTACAGGAGGATTACCTCCCGGCCGGCCGGCCGGCCGGCTCCTGCGTCCAT
AAGTGCTAC;

[0081] SEQ ID NO.26:Msex_247|CCAGCC|7

[0082] CCGAACCTGTGGTTGAGGAGCCACCCCCACCACCACCTCCTCCACCAGCGCCGGAGCCGGAGCCAGCC
CCAGCCCCAGCCCCAGCCCCAGCCCCAGCCCCAGCTCCCGAGCCAGCGCCACCAACCCCTCCGCTCCCC
CACCACCAGCACCAGCACCAGCTCCGCCGCTGCCATGTTGAGGTCGTGGTT;

[0083] SEQ ID NO.27:Msex_246|CCACTC|5

[0084] TAAAGCAAGCACCCACTCCACTCCACTCCACTCCACTCCACTCCACTCCACTCAATCATCCAA
CGGCGAATAATCTCTCCCATCCTGCACCCCATCCCCACACTATCCACCTTCAACAACAAATCCACACTCTCATCC
CTCTCATCATCGCCATCATTCTCATGCGGGACT;

[0085] SEQ ID NO.28:Msex_235|CCA|5

[0086] ATTACCATGAGCGCCCATGACCTCCACCACCACCACCACCACCACCACCACCAATGACCTTGTTGTG
CCACAACATCTCTCGCGCTCACCTCCTTCCACCACAAATGCTGGCATCCACGAGCCTGCGTCTTCCACCACGGT
AAGCTAGCCTACTCGC;

[0087] SEQ ID NO.29:Msex_213|CAT|19

[0088] ACTTCGACCTGCAGTAACCCTTTTAGCTACAGTAATACTTTGTGTAGCAGTAATTTTACGTTTTTTGG
TCCTGGCAAGGCCACCGCCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATC
GTCGTCGTCTCTGCCATCATCTCAGAGTCACTCTCGGG;

[0089] SEQ ID NO.30:Msex_209|CAGCCG|5

[0090] GATGGGGCAGAGGCTATTCCGCCGCCCATATGAGCGCCATCCAAACCAGCCGCAGCCGCAGCCGCA
GCCGCAGCCGCAGCCTCAGCTGACTGCATACCAGCAACAGCA;

[0091] SEQ ID NO.31:Msex_194|CAC|9

[0092] GTCTTTGTGCGAGCACCAAGCAAGGAACCACGAGCATAGTAACACTCAGCTCCCCAACACCACCACC
ACCACCACCACCACCACCATTTCCATTCCATTCCATTCCATAACCATTTCCACCACCCACTACACCGCCACTC
CCACAACCACCCACACCACCACAATCAA;

[0093] SEQ ID NO.32:Msex_193|CAC|8

[0094] GGCGCGTCTCAAAGGAAAAGAAACCCTATTCCAAACCCTTAATCTCTTGCGGGCCACCAACCACCACA
TCACATCCCACTTCAACCCTCATTGTTCCCCCTCTCAAACCAACACCACCACCACCACCACCACCACACGGAT
ACCTCAACTGCCCGTGAAG;

[0095] SEQ ID NO.33:Msex_177|CAA|5

[0096] TTCCAGGCTCAGATCAACCGCGCATGAGCGTGCGCAACAACAACAACAACAGCAGCAGGTTCCCAAT
AGCGGGGCCGAAGGGTACTACAGCGACACGGAG;

[0097] SEQ ID NO.34:Msex_173|CA|8

[0098] CACAGCACACTCTACGCAGAGTTGATGATATCCACAACCTGCACACACACACACACACCCCGTTAGCCA
ACAAACCCACACAAAGCGCATTCCGGGGAAAACCTCACAGG;

[0099] SEQ ID NO.35:Msex_159|CA|10

[0100] ACCACACCTGCAACACCTACATACTCACACACACACACACACATACTCGCTCGCACCCTC
CCACCTCAGCATCCAGGCTTAGAACAGAATAGCCACGCTGCACGTGCTTGGATCGTCCCTATTCAGCCAATTAACG

CTCCATAAGTGC GGTCGGAAGGGAACAAGGCCTTGA;

[0101] SEQ ID NO.36:Msex_116|AT|6

[0102] GCATAACGCCGCGCTATAACCGGCATATTATACCGAGCTATAATTCCAAAAGGCTGTAGAAAAACAT
TTTGGGGGGAAAAAGACTTGAGTACTTGAAAAAAAAAGTAATGAACATAAATACATATATATATATATATA
TATATATACATATACGATAAAGTAGTTTCTCGCACGCG;

[0103] SEQ ID NO.37:Msex_10|AAG|17

[0104] CAAACAAGGTGGCAGGAAGCTGTTGACTGACTGGCTAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA
GAAGAAGAAGAAGAAGATCATGCCCCCGTGCCTTCTTGAATGCTGGTTGTGGTGGGGCGTGAGTGTGAGTAGTC
AGAGCCTCCTCCTT。

[0105] 本发明还提供了用于扩增上述技术方案所述六妹羊肚菌SSR分子标记的引物组，所述引物组包括所述37个SSR分子标记的引物对，所述37个SSR分子标记的引物对的核苷酸序列如SEQ ID NO.38~SEQ ID NO.111所示。

[0106] 在本发明中，所述37个SSR分子标记的引物对的信息优选如表1和表2所示：

[0107] 表1 37个SSR分子标记的引物对的核苷酸序列

标记名称	正向引物 5'→3'	编号	反向引物 5'→3'	编号
Msex_82	CCAGCCAGTTGTTGACCAGT	SEQ ID NO.38	TGACCGGCCAGCTTACATAG	SEQ ID NO.39
Msex_713	CACAATTGGGAGAGGCGGTA	SEQ ID NO.40	TGATGGAGAGAGACCCGCTA	SEQ ID NO.41
Msex_709	CTGCTGCTGCTGTTGTTGTT	SEQ ID NO.42	CCCGTCGTCGTAITCTCCAG	SEQ ID NO.43
Msex_692	CAACCCAGGCAGATCCGTAC	SEQ ID NO.44	AGCTGCGAGGTAATGATGGG	SEQ ID NO.45
Msex_658	TGAACCCAGCGTGTGTGTAT	SEQ ID NO.46	CGGATTCAAGCGACTGTTGC	SEQ ID NO.47
Msex_650	AACGACCTCACACAGAGCAG	SEQ ID NO.48	CATCCAGGCTGGGGTTAGT	SEQ ID NO.49
Msex_621	TGCTGCTGCAGTGATTGAGA	SEQ ID NO.50	CGACCGTGAAAAGTCCCTCT	SEQ ID NO.51
Msex_620	CCATCTCGTGTGAGCTGTGT	SEQ ID NO.52	CTTGGTACCCACGAACACGA	SEQ ID NO.53
Msex_615	GCCTTGTGCCTTGCAGAAAA	SEQ ID NO.54	AGACGATAACGACGCCTACG	SEQ ID NO.55
Msex_576	GCTTGTGGTCGTGAAGCATT	SEQ ID NO.56	TCACATGGGCGCCGTTAATA	SEQ ID NO.57
Msex_558	TGACTGTAGTGGTGGGGTGA	SEQ ID NO.58	CCAATACTCCCCACCACACC	SEQ ID NO.59
Msex_553	AGGATCTGTGTTGTACGTCGT	SEQ ID NO.60	CATGTGACGCAACCCTTGG	SEQ ID NO.61
Msex_548	CAGTCAGTGTCACGGATGGA	SEQ ID NO.62	AGTGAGCAAGTGGGGAAATCG	SEQ ID NO.63
Msex_546	AAAGAGGCAGAGCAGCTAGC	SEQ ID NO.64	ACGGGCGGTGTTTTATTCCA	SEQ ID NO.65
Msex_54	AGATGGGCAGCAGATCAACA	SEQ ID NO.66	TGACCCTCTCTCCGTCCAT	SEQ ID NO.67
Msex_523	TGGTATACGGGAAGGTGGGT	SEQ ID NO.68	CCACACCACCATCGTTGTCA	SEQ ID NO.69
Msex_519	TGAGGAGAGGAGGAGGTGGA	SEQ ID NO.70	TCGTGTGTCGTGAGTCTGTG	SEQ ID NO.71
Msex_5	ATTTGAGGACGGTGAGGTG	SEQ ID NO.72	GTGCTCGGGTTTGTAGCTCT	SEQ ID NO.73
Msex_491	GGGCTCCAGAACCTGTTCTC	SEQ ID NO.74	CGCCAAGTATTCAACGCAT	SEQ ID NO.75
Msex_49	ATCATTCCATGGCGGGTGTT	SEQ ID NO.76	AGCCCACTACTGCTCTAGCT	SEQ ID NO.77
Msex_455	GTGAAGTGGGCATCATTGCG	SEQ ID NO.78	AGGACGACCTCGACAACAAG	SEQ ID NO.79
Msex_426	GCACCAAGCAGCAGGATAGT	SEQ ID NO.80	GCGTCGCTCTCTTCTTCTT	SEQ ID NO.81
Msex_367	CTGTTGTGCGCTTGGAGTG	SEQ ID NO.82	ACAACCCATACCAGCAGCAA	SEQ ID NO.83
Msex_332	TGCTGCTTACCTCTACACG	SEQ ID NO.84	TGGTACTGTGAGTGTGCAA	SEQ ID NO.85
Msex_279	GGCCTAAGTTGCTGTGGAT	SEQ ID NO.86	GTAGCACTTATGGACGCAGGA	SEQ ID NO.87
Msex_247	CCGAACCTGTGGTTGAGGAG	SEQ ID NO.88	AACCACGACCTCAACATGGG	SEQ ID NO.89
Msex_246	TAAAGCAAGCACCCACTCCA	SEQ ID NO.90	AGTCGCCGCATGAGAATGAT	SEQ ID NO.91
Msex_235	ATTACCATGAGCGCCCATG	SEQ ID NO.92	GCGAGTAGGCTAGCTTACCG	SEQ ID NO.93
Msex_213	ACTTCGACCTGCAGTAACCC	SEQ ID NO.94	CCCGAGAGTGACTCTGAGGA	SEQ ID NO.95
Msex_209	GATGGGGCAGAGGCTATTCC	SEQ ID NO.96	TGCTGTTGCTGGTATGCAGT	SEQ ID NO.97
Msex_194	GTCTTTGTGCGAGCACC AAG	SEQ ID NO.98	TTGATTGTGGTGGTGTGGGT	SEQ ID NO.99
Msex_193	GGCGCTCTCAAAGGAAAAG	SEQ ID NO.100	CTTCACGGGCAGTTGAGGTA	SEQ ID NO.101
Msex_177	TTCCAGGCTCAGATCAACCG	SEQ ID NO.102	CTCCGTGTCGCTGTAGTACC	SEQ ID NO.103
Msex_173	CACAGCACACTTACGCAGA	SEQ ID NO.104	CCTGTGAGTTTTCCCGGAA	SEQ ID NO.105
Msex_159	ACCACACCTGCAACACCTAC	SEQ ID NO.106	TCAAGGCCTTGTTCCTTCC	SEQ ID NO.107
Msex_116	GCATAACGCCGCTATAAC	SEQ ID NO.108	CGCGTGCAGAACTACTTT	SEQ ID NO.109
Msex_10	CAAACAAGGTGGCAGGAAGC	SEQ ID NO.110	AAGGAGAGGAGGCTCTGACT	SEQ ID NO.111

[0108]

[0109] 表2 37个SSR分子标记的引物对扩增产物的相关信息

[0110]

标记名称	重复序列基序特征	PCR 产物大小 (bp)	重复序列的重复次数
Msex_82	AGCC	196	3-8
Msex_713	TGTC	193	8-14
Msex_709	TGT	127	14-28
Msex_692	TGG	167	11-16
Msex_658	TG	187	6-12
Msex_650	TCT	178	6-14
Msex_621	TC	157	15-24
Msex_620	TC	119	14-18
Msex_615	TAG	181	6-10
Msex_576	TA	172	11-15
Msex_558	GTG	150	6-11
Msex_553	GTG	194	16-26
Msex_548	GTCT	195	9-13
Msex_546	GTCT	141	8-11
Msex_54	AG	168	6-10
Msex_523	GGT	130	6-12
Msex_519	GGT	190	5-10
Msex_5	AAC	165	7-13
Msex_491	GGA	189	3-8
Msex_49	AG	188	13-26
Msex_455	GCACCA	199	3-7
Msex_426	GAG	169	6-16
Msex_367	CTG	185	5-11
Msex_332	CT	164	8-16
Msex_279	CCGG	153	3-7
Msex_247	CCAGCC	197	3-7
Msex_246	CCACTC	178	3-5
Msex_235	CCA	160	5-9
Msex_213	CAT	186	12-19
Msex_209	CAGCCG	110	3-7
Msex_194	CAC	172	9-15
Msex_193	CAC	163	8-13
Msex_177	CAA	102	5-9
Msex_173	CA	109	8-16
Msex_159	CA	180	4-10
Msex_116	AT	182	6-13
Msex_10	AAG	160	12-17

[0111] 本发明还提供了上述技术方案所述的六妹羊肚菌SSR分子标记或上述技术方案所述的引物组在六妹羊肚菌的遗传学分析、育种和种质鉴定中的一种或多种中的应用,优选为遗传学分析。

[0112] 在本发明中,本发明所述遗传学分析优选包括遗传多样性分析、群体遗传结构分析、基因流分析、聚类分析和构建分子指纹图谱中的一种或多种,更优选为遗传多样性分析、群体遗传结构分析、基因流分析和聚类分析。

[0113] 本发明以所述六妹羊肚菌SSR分子标记为目标序列设计引物,以设计得到的引物组对六妹羊肚菌进行扩增,扩增结果稳定性好,多态性高,可以用于六妹羊肚菌的遗传学分析、育种和种质鉴定。

[0114] 本发明还提供了一种用于六妹羊肚菌的遗传学分析的试剂盒,所述试剂盒包括上

述技术方案所述的引物组和PCR扩增试剂。本发明对所述PCR扩增试剂的来源和具体组分没有特殊限定,采用本领域中常规PCR扩增试剂即可,如本发明实施例中采用的PCR扩增试剂为购买于北京擎科生物科技有限公司的成品Mix (Tsingke TSE101, Mix Green)。

[0115] 本发明还提供了一种六妹羊肚菌的遗传学分析方法,包括如下步骤:

[0116] 以上述技术方案所述的引物组对六妹羊肚菌基因组DNA进行PCR扩增,得到扩增产物;

[0117] 将所述扩增产物进行电泳检测,得到多态性扩增条带;

[0118] 对所述多态性扩增条带进行遗传学分析。

[0119] 本发明以上述技术方案所述的引物组对六妹羊肚菌基因组DNA进行PCR扩增,得到扩增产物。进行所述PCR扩增前,本发明优选提取六妹羊肚菌的基因组DNA。本发明对所述基因组DNA的提取方法没有特殊限定,采用本领域中常规基因组DNA的提取方法即可,如商用试剂盒或CTAB法,提取得到的基因组DNA稀释至25-50ng/ μ L。

[0120] 得到所述六妹羊肚菌基因组DNA后,本发明以上述技术方案所述的引物组对六妹羊肚菌基因组DNA进行PCR扩增,得到扩增产物。本发明所述PCR扩增的体系优选包括:Mix (green) 17 μ L、10 μ M的正向引物 1 μ L、10 μ M的反向引物1 μ L、六妹羊肚菌基因组DNA 1 μ L。本发明所述PCR扩增程序优选包括:98 $^{\circ}$ C预变性2min;98 $^{\circ}$ C变性10s,60 $^{\circ}$ C退火10s,72 $^{\circ}$ C延伸10s,共35个循环;72 $^{\circ}$ C终延伸5min。

[0121] 得到所述扩增产物后,本发明将所述扩增产物进行电泳检测,得到多态性扩增条带。本发明所述电泳检测优选为毛细管电泳。本发明优选采用3730x1测序仪进行所述毛细管电泳。本发明对所述毛细管电泳的具体过程没有特殊限定,采用本领域常规毛细管电泳过程即可。

[0122] 得到所述多态性扩增条带后,本发明优选对所述多态性扩增条带进行数据矫正及整理,建立原始数据矩阵。本发明优选采用GenAlEx软件进行所述数据矫正及整理,所述GenAlEx软件的版本优选为version 6.501,具体包括:将对每个六妹羊肚菌菌株的特异性条带以0和1的方式进行统计替换,1表示有条带,0表示没有条带。

[0123] 得到所述原始数据矩阵后,本发明优选以所述原始数据矩阵进行遗传学分析。本发明所述遗传学分析优选包括遗传多样性分析、群体遗传结构分析、基因流分析和聚类分析。

[0124] 本发明所述遗传多样性分析优选包括计算各SSR分子标记位点的等位基因、有效等位基因、私有等位基因和香农指数中的一种或多种,更优选计算各SSR分子标记位点的等位基因、有效等位基因、私有等位基因和香农指数。本发明优选采用GenAlEx和Popgen32软件进行所述遗传多样性分析,所述GenAlEx软件的版本优选为version 6.501。

[0125] 本发明优选采用STRUCTURE软件进行所述群体遗传结构分析,所述STRUCTURE软件的版本优选为version 2.3.3,具体优选包括采用马尔科夫链(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)方法预设群体分组(K),依据等位基因频率对个体进行计算、抽样和分组。本发明所述群体遗传结构分析中的K值的范围优选为1~10,每个K值进行10次独立的runs,每个循环的重复抽样次数设置为100,000次。本发明优选于STRUCTURE HARVESTER(http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/)网站中,参照Evanno et al. (Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals

using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.)的方法,计算最适K值。

[0126] 本发明优选采用NTSYS软件进行所述聚类分析,具体优选包括:在NTSYS软件的similarity模块中获得相似性矩阵或距离矩阵,再在clustering模块中得到聚类树。

[0127] 本发明所述基因流分析优选按Wright (Wright, S. 1931. *Evolution in Mendelian populations*. *Genetics* 16: 97-159.)的公式来计算,所述公示具体为: $Nm = 0.25(1 - G_{st})/G_{st}$,其中Nm为基因流,G_{st}为遗传分化系数。

[0128] 为了进一步说明本发明,下面结合附图和实施例对本发明提供的技术方案进行详细地描述,但不能将它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0129] 实施例1 六妹羊肚菌全基因组水平的SSR分子标记开发及特征

[0130] 37个六妹羊肚菌SSR分子标记的来源,步骤如下:

[0131] 1)六妹羊肚菌2015-9号菌株基因组测序和de novo组装

[0132] 本申请人早期基于二代和三代整合的基因组测序方案,获得了六妹羊肚菌2015-114菌株的基因组测序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JAMGYU000000000/>) (刘伟. 梯棱羊肚菌生长发育过程及羊肚菌属的组学研究. 华中农业大学, 2020. DOI: 10.27158/d.cnki.ghznu.2020.000544)。2015-114基因组大小52.997Mb,共包含28个contig,基因组N50 1.90Mb,BUSCO基因完整性评价显示达到了99.12%,表明这是一个高质量的六妹羊肚菌基因组。

[0133] 2)六个六妹羊肚菌菌株基因组二代测序及基因组de novo组装

[0134] 以二代Illumina HiSeq 4000 双末端PE500的测序方案,分别对六个六妹羊肚菌: 20D02A (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR16686507/>)、20D14A (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR16686504/>)、20D16A (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR16686502/>)、20D17A (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR16686501/>)、20D20A (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR16686498/>)和20D22A (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR16686495/>)进行测序,每个菌株分别测序4G的rawdata,使用二代基因组组装软件SPAdes(v.3.15.3)分别对六个菌株进行基因组组装,SPAdes具体参数:spades.py --isolate --pe-1 1 1.fastq --pe-2 1 2.fastq -t80 -k91 --cov-cutoff auto -m 1000-o./K91。

[0135] 组装结果显示,六个菌株分别组装得到了52.19Mb、54.05Mb、52.64Mb、51.65Mb、52.01Mb和51.67Mb,与参考基因组2015-114的53.33Mb相比,近似一致,表明本文通过二代基因组的de novo组装获得了质量相当的完整基因组序列,可以确保用于比较基因组水平SSR标记开发的完整性和准确度。

[0136] 3)六妹羊肚菌基因组范围内通用型SSR位点检测

[0137] 以2015-114菌株的高质量基因组为参考,使用CandiSSR软件,整合20D02A、20D14A、20D16A、20D17A、20D20A和20D22A的六套新组装的六妹羊肚菌基因组,进行六妹羊肚菌基因组通用型SSR分子标记的开发,脚本使用参数如下:CandiSSR.pl -i morexi.ctl -o morexi out -l 200 -t 100。

[0138] 结果显示:在七个六妹羊肚菌基因组间,总计检测到共性SSR位点732个,剔除在任何一个基因组中有缺失的SSR位点后,共有595个候选SSR微卫星位点,重复单元为双碱基至

六碱基重复,重复次数在5-37个之间。

[0139] 4) 六妹羊肚菌基因组范围内通用型SSR标记的开发

[0140] 提取候选SSR位点上下游250bp序列,使用Primer3.0软件进行SSR引物的开发,设定候选引物退火温度 $60^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$,PCR产物125bp-300bp,引物长度 $20\text{bp} \pm 3\text{bp}$,候选引物数量5条。结果显示,所有的候选SSR位点均可以成功设计得到相应的SSR引物。

[0141] 结合PCR产物长度、多态性大小差异、引物的匹配度、候选位点多态性的标准差,引物在三个基因组中缺失率、物种间的可转移性,对前述的SSR位点和引物进行筛选,最终选择多态性最高、可转移性最好的37对引物对作为候选六妹羊肚菌通用型SSR引物,37个SSR位点的信息如上述具体实施方式部分所述;37对引物对的相关信息如上述表1~2所示,不再进行赘述。

[0142] 实施例2 六妹羊肚菌群体的SSR分子标记多样性检测

[0143] 六妹羊肚菌的37对SSR引物在六妹羊肚菌群体中的扩增检测,步骤如下:

[0144] 供试六妹羊肚菌群体包含20个来源清晰的人工栽培菌株,所有菌株经过ITS-RPB1-RPB2-EF1a-LUS多基因系统发育树的构建确定其没分类地位,详情如表3所示。

[0145] 表3 20个六妹羊肚菌群体样本信息特征

菌株名称	采集地	采集时间	多基因系统发育学名称
TH_2A301	四川青川	2018	<i>Morchella sextelata</i>
Z613	重庆彭水	2016	<i>Morchella sextelata</i>
SZL-4	湖北松滋	2016	<i>Morchella sextelata</i>
Z612	重庆彭水	2016	<i>Morchella sextelata</i>
TH_302	四川青川	2018	<i>Morchella sextelata</i>
TH_A401	四川青川	2018	<i>Morchella sextelata</i>
HE_G2	四川绵阳	2021	<i>Morchella sextelata</i>
HE_G8	四川绵阳	2021	<i>Morchella sextelata</i>
HE_G4	四川绵阳	2021	<i>Morchella sextelata</i>
HE_M22	四川绵阳	2021	<i>Morchella sextelata</i>
HE_M221	四川绵阳	2021	<i>Morchella sextelata</i>
HE_M228	四川绵阳	2020	<i>Morchella sextelata</i>
HE_909	四川绵阳	2020	<i>Morchella sextelata</i>
HE_M925211	四川绵阳	2021	<i>Morchella sextelata</i>
HE_M925212	四川绵阳	2021	<i>Morchella sextelata</i>
SZL-1	湖北松滋	2016	<i>Morchella sextelata</i>
SC_N4	四川绵阳	2013	<i>Morchella sextelata</i>
16-122	四川德阳	2016	<i>Morchella sextelata</i>
2016-38	四川绵阳	2016	<i>Morchella sextelata</i>
SZL-3	湖北松滋	2016	<i>Morchella sextelata</i>

[0146]

[0147] 按照3730x1测序仪的测序标准,引物合成添加FAM荧光信号,PCR产物通过3730x1测序仪进行检测,得到的数据进行Genemapper软件分析,根据分析结果,判断不同引物是否具有片段多态性。

[0148] PCR扩增体系:Mix (green) 17 μL 、10 μM 正向引物 1 μL 、10 μM 反向引物1 μL 、基因组DNA (gDNA) 1 μL 。

[0149] PCR反应程序:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2min;98 $^{\circ}\text{C}$ 变性10s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火10s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10s,共35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸5min。

[0150] 检测实例结果如图1所示,其为Msex_5 SSR标记对部分样品的扩增产物检测结果,

同时所有的37对SSR引物均可以在20个六妹羊肚菌菌株中得到稳定的扩增产物,说明本发明设计的引物在六妹羊肚菌种群中具有高稳定性。37对SSR引物在20个六妹羊肚菌群体中,平均扩增得到1.9条多态性条带,最多的多态性条带数量达到5条。

[0151] 实施例3 六妹羊肚菌群体的SSR遗传多样性分析

[0152] 六妹羊肚菌群体SSR分子标记的遗传学分析,步骤如下:

[0153] 1)数据矫正及整理:将每个个体的特异性条带以0和1的方式统计,1表示有条带,0表示没有条带,最终建立原始数据矩阵,如图2所示。数据的编辑和格式转化在GenAlEx version 6.501软件中进行。

[0154] 2)遗传多样性分析:在GenAlEx version 6.501和Popgen32软件中,分别计算SSR位点的各项遗传多样性指标,包括观测等位基因(N_a)、有效等位基因(N_e)、私有等位基因(N_p)和香农指数(I)。

[0155] 遗传多样性分析结果显示:37对引物在20个样本个体中共检测出73个等位基因位点,结果如表4所示:其中,最小等位基因数目为1(Msex_332、Msex_336、Msex_426、Msex_491、Msex_553、Msex_558),最大等位基因数目为5(Msex_658),平均等位基因数目为1.8904。有效等位基因(N_e ,等位基因在群体中分布得越均匀, N_e 越接近实际检测到的等位基因的个数)总数为58.8586,数值变化范围为1.0000(Msex_279、Msex_332、Msex_336、Msex_426、Msex_491、Msex_553、Msex_558)-1.9867(Msex_177、Msex_209),平均每个位点有效等位基因数目为1.6236。多样性指数(H)的数值范围为0.0000(Msex_279、Msex_332、Msex_336、Msex_426、Msex_491、Msex_553、Msex_558)-0.4967(Msex_177、Msex_209),平均值为0.3489。香农指数(I)的数值范围为0.0000(Msex_279、Msex_332、Msex_336、Msex_426、Msex_491、Msex_553、Msex_558)-0.6898(Msex_177、Msex_209),平均值0.5091。

[0156] 表4 六妹羊肚菌37对通用性SSR引物的群体评价

[0157]

引物	总条代数	多态性位 点数 AP	PP (%)	Na	Ne	H	I
Msex_5	25	2	8.00%	2.0000	1.8834	0.4688	0.6615
Msex_10	24	2	8.33%	2.0000	1.7556	0.4198	0.6081
Msex_49	23	3	13.04%	2.0000	1.5193	0.3067	0.4666
Msex_54	23	2	8.70%	2.0000	1.4061	0.2843	0.4563
Msex_82	23	3	13.04%	2.0000	1.5522	0.3226	0.4847
Msex_159	22	2	9.09%	2.0000	1.7527	0.4248	0.6149
Msex_173	21	2	9.52%	2.0000	1.7352	0.4234	0.6144
Msex_177	23	2	8.70%	2.0000	1.9867	0.4967	0.6898
Msex_193	22	2	9.09%	2.0000	1.5736	0.3447	0.5217
Msex_194	19	2	10.53%	2.0000	1.5809	0.3202	0.4811
Msex_209	23	2	8.70%	2.0000	1.9867	0.4967	0.6898
Msex_213	23	2	8.70%	2.0000	1.5924	0.3586	0.5398
Msex_235	24	2	8.33%	2.0000	1.7351	0.4172	0.6063
Msex_246	21	2	9.52%	2.0000	1.7636	0.4325	0.6239
Msex_247	21	2	9.52%	2.0000	1.7940	0.4405	0.6320
Msex_279	42	2	4.76%	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Msex_332	21	1	4.76%	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Msex_336	21	1	4.76%	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Msex_367	22	2	9.09%	2.0000	1.7527	0.4248	0.6149
Msex_426	21	1	4.76%	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Msex_455	24	2	8.33%	2.0000	1.8227	0.4475	0.6389
Msex_491	21	1	4.76%	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Msex_519	24	2	8.33%	2.0000	1.8044	0.4395	0.6299
Msex_523	21	2	9.52%	2.0000	1.9612	0.4901	0.6832
Msex_546	22	2	9.09%	2.0000	1.7250	0.4091	0.5966
Msex_548	21	2	9.52%	2.0000	1.5374	0.3219	0.4917
Msex_553	21	1	4.76%	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Msex_558	21	1	4.76%	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Msex_576	21	2	9.52%	2.0000	1.6789	0.3824	0.5640
Msex_615	22	2	9.09%	2.0000	1.7638	0.4248	0.6140
Msex_620	23	2	8.70%	2.0000	1.9372	0.4837	0.6767
Msex_621	23	2	8.70%	2.0000	1.7851	0.4334	0.6235
Msex_650	24	2	8.33%	2.0000	1.9297	0.4811	0.6740
Msex_658	20	5	25.00%	2.0000	1.2444	0.1767	0.3018
Msex_692	22	2	9.09%	2.0000	1.7821	0.4342	0.6249
Msex_709	23	2	8.70%	2.0000	1.7742	0.4274	0.6166
Msex_713	21	2	9.52%	2.0000	1.7431	0.4231	0.6134
Mean	22.6486	1.9730	8.83%	1.8904	1.6236	0.3489	0.5091

[0158] 3) 群体遗传结构分析: 基于贝叶斯模型的群体聚类方法, 本发明的群体遗传结构在STRUCTURE version 2.3.3 软件中进行。采用的马尔科夫链(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)方法可以预设群体分组(K)同时根据等位基因频率对个体进行计算、抽样和分组。参数设置: 设K值范围为1-10, 每个K值进行10次独立的runs, 每个循环的重复抽样次

数设置为100,000次。最终,在STRUCTURE HARVESTER(http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/)网站中,基于Evanno et al (2005)的方法,计算最适K值。

[0159] 结果表明:在STRUCTURE HARVESTER中根据Evanno et al (2005)的方法计算得到的最适delta K值为2,表明3个群体中2个基因库的存在。结果显示,当K=2时,种群1的样本的基因组成主要来源于基因库2;种群2的样本的基因组成主要来源于基因库1和2;种群3的样本的基因组成主要来源于基因库1。

[0160] 4)在NTSYS中计算得到相似性矩阵文件之后,基于相似性矩阵采用非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)分别建立个体的聚类树。具体方法:在NTSYS软件的在similarity模块中得到相似性矩阵或距离矩阵,再在clustering模块中得到聚类树。

[0161] 聚类结果如图3所示,除两个内置阴性对照菌株HE_M925在37对引物中具有一致的扩增结果在100%的相似度下被聚类在一个分支外,其余的18个六妹羊肚菌菌株分别被聚类在不同的分支下,样品间的最低相似度为53%,最高约82.5%,表明供试的六妹羊肚菌群体间具有较高的遗传分化。

[0162] 5)为了解野生群体间遗传关系,在Popgen32中对群体间的遗传距离(Nei, 1972)进行计算。基于遗传距离和遗传相似矩阵,本发明构建了个体和群体的UPGMA树,进行聚类分析。

[0163] 表5 群体间的遗传同一性(上三角)和遗传距离(下三角)

pop ID	Pop1	Pop2	Pop3
Pop1	****	0.9118	0.7665
Pop2	0.0923	****	0.8661
Pop3	0.2660	0.1438	****

[0165] 由表5可以得出:基于个体的UPGMA图显示出组间和群体间的个体存在着较多的交叉混合,表明群体内存在较多的遗传变异,主坐标分析也支持三个群体的划分。

[0166] 6)分子方差分析(AMOVA)和基因流估算:根据群体遗传结构分析结果,在GenAlEx version 6.501 软件中计算各群体间和群体内的变异、分化并进行显著性检验。基因流(Nm)按Wright (1931)的公式来计算: $Nm = 0.25(1 - G_{st})/G_{st}$ 。

[0167] 基于Nei的遗传距离,对20六妹羊肚菌菌株的SSR扩增多态性进行了主坐标分析,如图4所示,和群体结构分析结果相一致,整体可划分为3个类群。群体1和群体2之间具有较高的遗传相似度。

[0168] 由以上结果可以得出:以本发明提供的六妹羊肚菌SSR分子标记及其所对应的引物组可以进行六妹羊肚菌的遗传学分析,尤其可以进行遗传多样性、群体遗传结构、聚类分析和基因流分析,具有很高的应用价值。

[0169] 尽管上述实施例对本发明做出了详尽的描述,但它仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部实施例,人们还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得其他实施例,这些实施例都属于本发明保护范围。

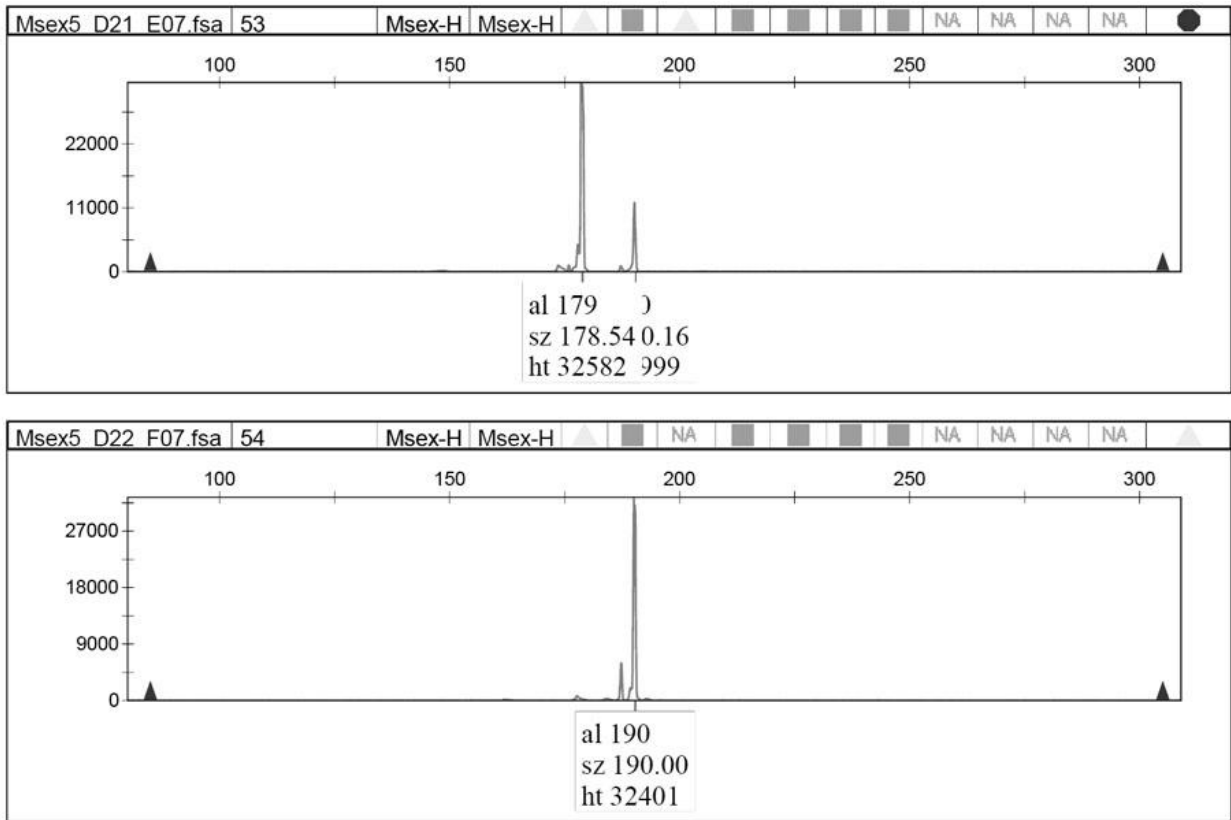


图 1

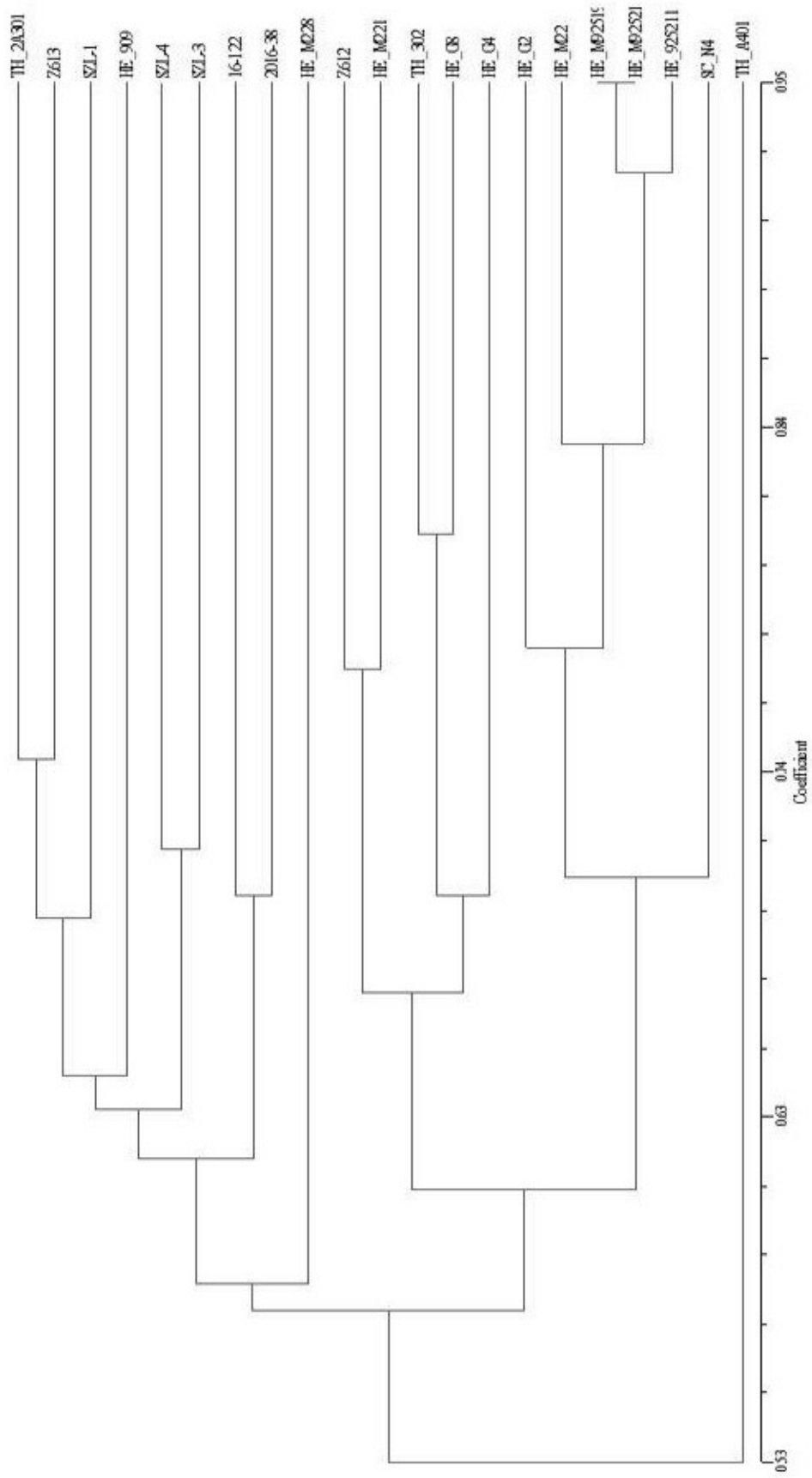


图 3

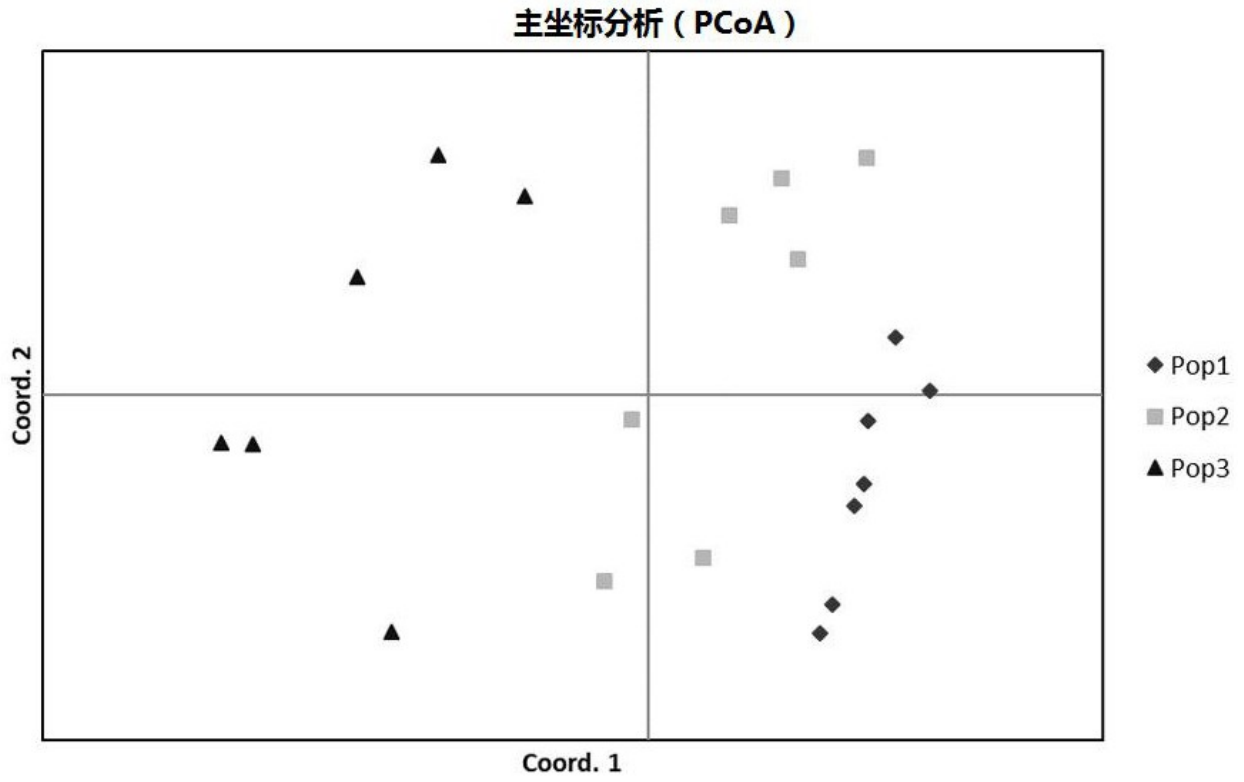


图 4