

大型真菌中 SSR 分子标记的开发与应用进展

王东东 李良秋* 马连营 陈爱枫 吴清平

(广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省华南应用微生物重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地 广东 广州 510070)

摘要: SSR 分子标记是近年来普遍应用的分子标记之一。大型真菌中常用的 SSR 分子标记开发策略有三类, 包括传统基因文库筛选法、富集文库筛选法和数据库筛选法, 其中富集文库筛选法因其分离效率高而被采用较多。本文综述大型真菌中 SSR 分子标记的应用现状, 发现相关研究多数集中于种系鉴定和遗传多样性分析, 有关遗传图谱构建和辅助育种虽有涉及但研究较少。讨论了 SSR 分子标记在大型真菌研究中存在的问题与发展前景。

关键词: 微卫星, 真菌, 综述

Progress in development and applications of SSR molecular marker in macrofungi

WANG Dong-Dong LI Liang-Qiu* MA Lian-Ying

CHEN Ai-Feng WU Qing-Ping

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: The SSR (simple sequence repeats) marker has become one of the most popular molecular markers recently. There are three strategies to develop SSR marker in macrofungi, traditional library method, enriched library method and GenBank screening. Among them, enriched library method has been used more frequently due to its higher efficiency. The applica-

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2011B020303004)

*通讯作者: Tel: 86-20-87688134; 邮箱: dylanw1112@gmail.com

收稿日期: 2012-07-22; 接受日期: 2012-10-08

tions of SSR marker in macrofungi are reviewed, with the conclusion that genetic identification and genetic diversity analysis are studied commonly while the genetic map construction and assistant breeding are still to be improved. In addition, the existing problems and developing prospects of SSR marker in macrofungi are discussed.

Keywords: Microsatellite, Fungi, Review

分子标记技术发展至今,已有三十多年的历史,该技术以个体间核苷酸序列变异为基础,通过对比分析来反映个体间或种群间的基因组差异。微卫星标记(Microsatellite markers)作为其中重要一类,因具有多态性丰富、共显性、易检测、结果准确等特点而被广泛应用。大型真菌是重要的菌物资源,相对其它物种,其微卫星标记研究仍处于起步阶段。笔者通过对大型真菌中常见微卫星标记的开发策略和应用现状进行简要概述,以期将来普遍应用该技术开展物种分子水平的研究提供借鉴。

1 SSR 标记的概念

微卫星(Microsatellite)也称简单序列重复(Simple sequence repeats, SSR),是一类在真核生物和原核生物基因组编码区和非编码区中广泛存在、分散分布、具有高度多态性的重复基因序列。构成这些短串联重复序列的基序通常由 1-6 个碱基组成^[1]。

SSR 位点高度变异,侧翼序列却相对保守^[2]。由于在种内或种间具有较高的突变率,因此 SSR 位点十分适合作为分子标记。目前 SSR 标记多应用于遗传作图、种系鉴定、遗传多样性、分子生态学及物种进化等领域的研究。

2 大型真菌中常见的 SSR 标记开发策略

SSR 标记技术是特异性扩增,能否得到足够

的 SSR 位点对于整个研究至关重要。与其它物种相比,大型真菌中 SSR 位点较少^[3],开发 SSR 标记有一定难度,但随着技术的进步,通过采用合适的位点分离方法也可获得满意的结果(表 1)。以下简要介绍目前大型真菌中常用的 SSR 标记开发策略与相关报道。

2.1 传统方法开发 SSR 标记

SSR 位点的传统分离法由 Rassmann 等^[4]于 1991 年创建,通过建立基因组文库,利用 SSR 探针杂交,从中获取 SSR 位点。传统分离法在大型真菌中有一定应用。Kretzer 等^[5]曾利用该法在酒红须腹菌(*Rhizopogon vinicolor*)中得到 6 个 SSR 标记;Barroso 等^[6]基于该法从双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)中分离出四核苷酸(TATG)₄,并在肺形侧耳(*Pleurotus pulmonarius*)、漏斗状侧耳(*Pleurotus sajor-caju*)和佛罗里达侧耳(*Pleurotus florida*)均扩增出了预期产物,表明该标记在野生型菌种和培养型菌种中具有通用性。此外,Roy 等^[7]也利用该方法在紫蜡蘑(*Laccaria amethystina*)中分离出 8 个 SSR 标记。

传统分离法容易上手且对设备要求不高,一般实验室即可开展,但因其阳性克隆产出率低,对于 SSR 数量较少的大型真菌来说该法分离效率不高,近年来已应用渐少。

2.2 富集法开发 SSR 标记

富集法提高了 SSR 位点得率,其实质是利用 SSR 探针杂交来富集 SSR 位点,这一方法建立在几种不同的技术基础上,包括 RAPD 技术^[8-9]、引

表 1 大型真菌 SSR 标记开发一览
Table 1 Summary of SSR marker development in macrofungi

种类 Species	SSR 开发策略 Strategies for SSR development	参考文献 References
黑木耳 <i>Auricularia auricula-judae</i>	FIASCO	Zhang 等, 2012 年
双孢蘑菇 <i>Agaricus bisporus</i>	传统分离法(基因组文库、探针) 尼龙膜富集法 基因数据库筛选	Barroso 等, 2000 年 Marie 等, 2009 年 Marie 等, 2009 年
赭鳞蘑菇 <i>Agaricus subrufescens</i>	生物素-磁珠富集法	Marie 等, 2012 年
灰盖鬼伞 <i>Coprinus cinereus</i>	基因数据库筛选	刘林等, 2006 年
蛹虫草 <i>Cordyceps militaris</i>	基因数据库筛选	管俊娇等, 2011 年
金针菇 <i>Flammulina velutipes</i>	FIASCO	Zhang 等, 2010 年
粘滑菇 <i>Hebeloma cylindrosporum</i>	基因数据库筛选	Jany 等, 2003 年
真姬菇 <i>Hypsizyguis marmoreus</i>	近缘物种查询	董岩等, 2009 年
紫蜡蘑 <i>Laccaria amethystina</i>	传统分离法(基因组文库、探针) ISSR-PCR 基因数据库筛选	Roy 等, 2008 年 Donges 等, 2008 年 Wadud 等, 2006 年 Vincenot 等, 2012 年
双色蜡蘑 <i>Laccaria bicolor</i>	生物素-磁珠富集法	Jany 等, 2006 年
香菇 <i>Lentinus edodes</i>	基因数据库筛选 近缘物种查询	刘春滢等, 2010 年 秦莲花等, 2004 年 Xiao 等, 2010 年
豆马勃 <i>Pisolithus</i>	ISSR-PCR	Kanchanaprayudh 等, 2002 年
刺芹侧耳 <i>Pleurotus eryngii</i>	生物素-磁珠富集法	Rosa 等, 2004 年
阿魏侧耳 <i>Pleurotus ferulae</i>	生物素-磁珠富集法	Rosa 等, 2004 年
秀珍菇 <i>Pleurotus geesteranus</i>	基因数据库筛选	忻雅等, 2008 年
糙皮侧耳 <i>Pleurotus ostreatus</i>	生物素-磁珠富集法	Ma 等, 2009 年
泡囊状须腹菌 <i>Rhizopogon vesiculosus</i>	生物素-磁珠富集法	Kretzer 等, 2003 年
酒红须腹菌 <i>Rhizopogon vinicolor</i>	传统分离法(基因组文库、探针) 生物素-磁珠富集法	Kretzer 等, 2000 年 Kretzer 等, 2003 年
粘盖牛肝菌 <i>Suillus bovinus</i>	ISSR-PCR	Kikuchi 等, 2007 年
厚环乳牛肝菌 <i>Suillus grevillei</i>	尼龙膜富集法	Zhou 等, 2001 年
松茸 <i>Tricholoma matsutake</i>	ISSR-PCR	Lian 等, 2003 年
白块菌 <i>Tuber magnatum</i>	FIASCO	Rubini 等, 2004 年 Rubini 等, 2005 年
黑孢块菌 <i>Tuber melanosporum</i>	基因数据库筛选	Murat 等, 2011 年

物延伸法^[10]、选择性杂交法^[11-12]以及 ISSR-PCR 技术^[13-14]等。由于富集法显著提高了 SSR 的筛选效率, 因此在大型真菌中采用得较多, 现有的文献主要采用其中的后两种方法。

2.2.1 选择性杂交法富集 SSR 位点: 此法一般分为尼龙膜富集法^[11]和生物素标记的磁珠富集法^[12]。二者大同小异, 不同处在于二者富集 SSR 位点的过程。尼龙膜富集法是将 SSR 探针固定在

尼龙膜上与基因组 DNA 杂交; 而生物素-磁珠富集法则是将 SSR 探针用生物素标记后与基因组 DNA 杂交, 再与链霉亲和素包被的磁珠结合。选择性杂交法分离 SSR 位点在大型真菌中应用广泛, 尤其是生物素-磁珠富集法, 由于它的探针处于液体介质中, 杂交反应较尼龙膜富集法更为充分, 故更适合大型真菌。尼龙膜富集法目前仅发现在厚环乳牛肝菌(*Suillus grevillei*)和双孢蘑菇中有所应用。Zhou 等^[15]应用尼龙膜富集法从 4 个富集文库中分离到 8 个 SSR 标记, 并从中挑选了 3 个多态性位点对厚环乳牛肝菌两个种群进行了基因流分析; Marie 等^[16]用该法从双孢蘑菇中获得 39 个 SSR 位点, 其中 17 个位点具有多态性。相比尼龙膜富集法, 生物素-磁珠富集法应用相对较多, 如 Rosa 等^[17]利用生物素-磁珠富集法从刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*)和阿魏侧耳(*P. ferulae*)中分离了 6 个具多态性的 SSR 位点; Kretzer 等^[18]和 Jany 等^[19]用该法分别在两种须腹菌(*Rhizopogon vesiculosus*, *R. vinicolor*)和双色蜡蘑(*Laccaria bicolor*)中开发出了 SSR 标记; 其它应用该法获取 SSR 标记的物种还包括糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)^[20]、赭鳞蘑菇(*Agaricus subrufescens*)^[21]等。值得关注的是, Marie 等^[21]在开发赭鳞蘑菇的 SSR 标记时, 吸纳了 Malausa 等^[22]的改进经验, 通过将生物素-磁珠富集法和最新一代测序技术相结合, 成功实现了高通量 SSR 的分离。

在选择性杂交法基础上, Zane 等^[23]于 2002 年发展出了 FIASCO 法, 该法应用 AFLP 技术, 但稍有不同的是, 其所用引物为简并引物, 基因组 DNA 片段均有被扩增的可能。大型真菌研究中, 近年来采用 FIASCO 法分离 SSR 标记的报道也开始增多, 如 Rubini 等^[24-25]曾于 2004 年和 2005 年应用 FIASCO 法在白块菌(*Tuber magnatum*)中共开发出 15 个 SSR 标记; 张瑞颖等利用该法在金

针菇(*Flammulina velutipes*)^[26]和黑木耳(*Auricularia auricula-judae*)^[27]中分别开发出 10 个和 17 个 SSR 标记。

2.2.2 基于 ISSR-PCR 技术富集 SSR 位点: 如果将 SSR 作为引物或引物一部分, 通过扩增 SSR 两侧保守序列, 也可以达到富集 SSR 位点的目的。该法既避免了 RAPD 技术富集 SSR 位点的随机性, 又无需构建及筛选文库。它包括简并引物法和 ISSR-双重抑制 PCR 技术, 其中后者由 Lian 等^[14]于 2001 年创建, 过程相当繁琐, 且容易出现假阳性^[28], 但优点在于分离 SSR 位点效率很高。

2002 年 Kanchanaprayudh 等^[29]尝试将 ISSR-双重抑制 PCR 技术用于豆马勃(*Pisolithus* sp.)的 SSR 位点分离, 效果较好, 随后陆续扩展到松茸(*Tricholoma matsutake*)^[30]、紫蜡蘑^[31-32]等。随着该技术的应用, 研究人员也在其基础上继续改进, 如 Kikuchi 等^[33]在研究粘盖牛肝菌(*Suillus bovinus*)时为阻止实验第二步的首次 PCR 中接头短链和引物错配, 采用了名为 API-2 的引物替代 API, 同时 DNA 用 *Alu* I 平末端限制了酶消化。Donges 等^[31]在研究紫蜡蘑时结合了 ISSR-双重抑制 PCR 技术和复合型 SSR 标记(CSSR), 改进了传统过程中耗时耗力的缺陷。

2.3 从数据库中筛选 SSR 标记

大规模测序计划的开展和物种数据库的建立, 为 SSR 位点的获取提供了便捷有效的途径, 目前应用较多的是表达序列标签(Expressed sequence tags, EST)文库。相比以上的分离方法, 由 EST 文库筛选到的 SSR 标记基本无需耗费人力物力, 并可对物种的重要性状直接进行基因定位, 唯一不足的是必须有对应物种的基因序列数据库。

大型真菌的基因组研究开始较晚, 不过发展很快, 越来越多的物种序列信息被提交到数据库

中,为 SSR 标记的开发创造了条件。如 Jany 等^[34]从下载的 548 条 EST 序列中筛选到 6 个 SSR 标记,并在 12 个个体中扩增出多态性,证明该法在粘滑菇(*Hebeloma cylindrosporum*)中具有可行性; Murat 等^[35]从 Genoscope 数据库筛选出 27 条黑孢块菌(*Tuber melanosporum*)的 SSR 标记,统计了该菌基因组的 SSR 类型,并在其它 48 种真菌中作了对比。近年来,国内采取数据库法筛选 SSR 标记的报道也逐渐增多,如刘林等^[36]利用该法分析了灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)的 SSR 组成和比例,发现该菌与其它真菌相比基因组中 SSR 的密度和数量都较小,而且不同基序的分布也有着显著差别;刘春滢等^[37]利用香菇(*Lentinus edodes*)的 EST 数据库设计了 40 对 SSR 引物,22 对具有多态性,多态率为 55%。其它采用数据库法筛选 SSR 标记的物种还包括双孢蘑菇^[16]、秀珍菇(*Pleurotus geesteranus*)^[38]、蛹虫草(*Cordyceps militaris*)^[39]、紫蜡蘑^[40]等。

另外,对于有相关研究的物种,或遗传距离相近的物种,还可通过在已发表的文献中查找引物或使用近缘物种的数据库来开发 SSR 标记。如 Vincenot 等^[40]直接引用了 Wadud 和 Roy 等在研究紫蜡蘑时开发的 SSR 标记,从而进一步研究了该物种在欧洲的基因流及在欧亚大陆的种群进化特征;秦莲花等^[41]利用从双孢蘑菇中分离出的四核苷酸(TATG)₄为引物,对香菇属的 3 个种 13 个菌株进行 PCR 扩增,结果呈现出多态性,验证了 (TATG)₄ 在香菇属中的通用性;董岩等^[42]将近缘物种香菇、灰盖鬼伞、糙皮侧耳中开发的 SSR 引物用于真姬菇(*Hypsizygus marmoreus*)的遗传多态性分析,筛选出了 23 对能够扩增出稳定带型且菌株之间带型差异明显的 SSR 标记,多态性比率达到 81.2%;肖扬等^[43]也将 25 条已发表的引物应用到香菇,对其 56 个种系进行了遗传多样性研究。

3 大型真菌中 SSR 标记的应用现状

目前,利用 SSR 标记开展的大型真菌研究主要集中在种系鉴定、种群变异和遗传多样性分析、构建遗传图谱及辅助育种等方面。

3.1 种系鉴定

由于具有多态性高和共显性的特征,SSR 标记成为大型真菌种系鉴定理想的分子标记,不仅能够分析确定物种的分类地位和遗传结构,而且结果更为精确,甚至可纠正传统分类方法导致的错误。如 Lian 等^[30]将松口蘑(*Tricholoma matsutake*)的 10 条 SSR 标记在北欧口蘑(*T. nauseosum*)中进行扩增,结果发现分离的 10 条 SSR 标记均有相似结果出现,据此推断这两个物种很可能为同一个种,这也与 Bergius 和 Danell 在 2000 年的研究结论一致。而 Donges 等^[31]在研究紫蜡蘑时发现,分离自不同地区的同一物种的 SSR 标记相互间表现出了较大差异,大部分的日本 SSR 标记在欧洲种中表现不出同等的多态性水平,在 Wadud 等先前的研究中,已发表的 9 条标记中只有 3 条在欧洲种中表现出共显性和多态性,他们推测或许是亚洲的紫色子实体不属于紫蜡蘑,也可能是由于远距离的分布造成样本 SSR 标记表现出不同。此处关于空间分布的推测,Vincenot 等^[40]在其最新的研究中也进行了表述,认为是地理隔离造成了这种差异。

SSR 标记同样可用于人工培育真菌的鉴定。如 Barroso 等^[6]将从双孢蘑菇中分离的 SSR 标记 (TATG)₄ 对 3 种人工培育的侧耳属真菌(*Pleurotus pulmonarius*、*P. sajor-caju* 和 *P. florida*)进行扩增,与预期设想结果一致;董岩等^[42]在用 SSR 标记分析常规栽培菌株和工厂化栽培菌株时,利用引物组合法可将所有试验菌株区分开来,表明 SSR 标记也可应用于非野生的大型真菌和生产菌株的鉴定。

3.2 种群变异和遗传多样性分析

大型真菌作为一类重要的菌物资源, 研究其种群变异和遗传多样性对于了解某一物种的起源及适应性、种质资源分布和培育驯化具有重要意义。迄今为止, 利用 SSR 标记开展的大型真菌研究也大多集中于这一领域。

Rubini 等^[24]用 SSR 标记评估了白块菌在意大利和巴尔干半岛部分区域的地理分布, 以证实该地区的野生种群是否产生了遗传分化, 结果显示偏南部和偏西北部的种群与其它地区存在着显著差异, 这些 SSR 标记的分析数据同时可用作推测白块菌在冰河期后的扩张模式。Kanchanaprayudh 等^[29]从桉树的外生菌根菌豆马勃中筛选到 6 个 SSR 标记, 将其应用到来自松树根部的同一物种时并无任何条带, 表明来源于不同宿主的豆马勃出现了种群分化。Zhou 等^[15]利用 SSR 标记研究相距 700 m 的两个厚环乳牛肝菌种群, 种群内和种群间基因流分析结果显示, 62.5% 的 SSR 位点具有多态性, 聚类分析发现多数基因型聚在一起, 由此他推测两个厚环乳牛肝菌种群内和种群间没有显著的遗传分化, 而等位基因的存在可能是由于孢子在短距离内的重复播散所造成。肖扬等^[43]在分析我国产野生香菇的遗传多样性时也发现, 来自云南、横断山脉、台湾和华南地区的野生香菇显示出比其它地区更为丰富的遗传多样性, 聚类分析结果表明我国南北方的香菇种系分化较大, 同一或相邻地区的种系多数情况下可归入同一小种群。

3.3 构建遗传图谱

构建遗传图谱, 可了解某一物种的特定基因在染色体上的相对位置, 从而研究该物种的基因组结构和进化历史。SSR 标记作为一种很好的锚定标记, 有助于图谱的连锁群或染色体的归并及不同连锁群的整合, 并且可为染色体原位杂交提供探针。大型真菌利用 SSR 标记来构建遗传图谱

的研究实例不多, 并往往同其它的分子标记配合使用。Moquet 等^[44]首次将 SSR 标记引入双孢蘑菇遗传图谱的构建过程, 他们通过分析, 将 26 个标记定位在了 5 个连锁群上, 并发现在同一连锁群上, 相同标记间距增大可导致标记间顺序发生变化, 表明群体数量大小直接影响到标记之间的准确定位。此后, Labbé 等^[45]结合 SSR 和 SNP 标记构建了双色蜡蘑的遗传图谱, 成功实现了物理图谱和遗传图谱的完美对应, 为后续研究提供了技术支撑。

尽管 SSR 标记的高多态性及稳定性等优点使它成为构建大型真菌遗传图谱的合适标记, 但目前并未真正走入应用, 这一方面是由于大型真菌基因功能表达调控的研究不够深入, 另一方面也与当前略显繁琐的 SSR 位点分离方法有关。

3.4 辅助育种

育种历来是大型真菌研究的重要方面, 尤其是食用菌产业的蓬勃发展, 更加凸显了育种工作的重要性。利用 SSR 标记, 研究人员可以通过基因定位来辅助选育新品种, 相比传统育种方法来说, 这一应用不仅改变了育种模式, 而且大大提高了育种效率。Larraya 等^[46]在对糙皮侧耳的高产和优质性状的基因定位研究中, 曾对某些含相关性状基因的杂合子进行筛选, 通过比较分析, 发现这些杂合菌株有部分在产量或质量上优于亲本菌株, 这为利用 SSR 标记开展经济类大型真菌的辅助育种提供了技术依据。我国许占伍等^[47]也曾通过研究 SSR 标记在真姬菇中的可传递性, 试图找到一种简捷快速的食用菌育种新方法, 可谓一个有益的尝试。

4 讨论

迄今大型真菌中开展的 SSR 标记研究已有十多年的历史, 研究对象和手段不断扩展, 部分研

究更为技术的进步做出了有价值的贡献,但与传统鉴定和前代分子标记相比,无论从研究体量还是成果来说,都略显不足。目前大型真菌中 SSR 标记的研究主要存在两个问题:一是 SSR 标记如何快速高效地获取。虽然当前已有不少大型真菌完成了基因组测定,但由于类群分布比较分散,大规模采用数据库法获取 SSR 位点还不现实,多数情况下要想获取足够的标记,不得不选用较为繁琐的筛选过程,客观上限制了 SSR 标记的推广应用;二是 SSR 标记的应用领域发展不均衡。SSR 标记出现之初,因其在大型真菌种系鉴定和遗传多样性分析等方面的独特优势,使得相关研究在这些领域蓬勃开展,近年来虽然在功能基因发掘及辅助育种等方面也有了长足发展,但总的说来进展缓慢。今后的研究除了要大力提高 SSR 位点得率,降低实验周期和成本之外,也要注重拓宽研究广度和深度,充分发挥该标记在指纹图谱绘制、起源进化和育种研究中的优势。

此外,研究人员对新技术的认识和接受程度也影响到 SSR 标记技术在大型真菌中的普遍应用。如 SSR 标记技术是以基因组研究为基础,要求研究者具有分子生物学相关理论和技术,这对习惯了传统分类鉴定和育种模式的研究人员是新的挑战,不仅要转变知识结构,同时对实验条件也有了新的要求,因此许多实验室仍然采用传统方法,而只把分子水平的研究作为辅助手段。以笔者团队为例,虽然认识到分子手段对于大型真菌研究的重要性,但限于实验条件,相关的鉴定和分析工作直到近些年才开展^[48-50],而对于 SSR 标记的实验方法仍在建立之中。

尽管起步晚,也有许多不足,但不可否认,SSR 标记在大型真菌研究中蕴藏着巨大的潜力。相信随着基因组研究的快速发展和实验技术的不断完善,SSR 标记在大型真菌中将会有更广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Bhargava A, Fuentes FF. Mutational dynamics of microsatellites[J]. *Molecular Biotechnology*, 2010, 44(3): 250-266.
- [2] 张增翠, 侯喜林. SSR 分子标记开发策略及评价[J]. *遗传*, 2004, 26(5): 763-768.
- [3] Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, et al. Challenges of microsatellite isolation in fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, 44(10): 933-949.
- [4] Rassmann K, Schlötterer C, Tautz D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(2/3): 113-118.
- [5] Kretzer AM, Molina R, Spatafora JW. Microsatellite markers for the ectomycorrhizal basidiomycete *Rhizopogon vinicolor*[J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9(8): 1190-1191.
- [6] Barroso G, Sonnenberg ASM, Van Griensven LJLD, et al. Molecular cloning of a widely distributed microsatellite core sequence from the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 31(2): 115-123.
- [7] Roy M, Dubois MP, Proffit M, et al. Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* is an actual multihost symbiont[J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17(12): 2825-2838.
- [8] Cifarelli RA, Gallitelli M, Cellini F. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite containing DNA clones[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(18): 3802-3803.
- [9] Lunt DH, Hutchinson WF, Carvalho GR. An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA)[J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8(5): 891-893.
- [10] Ostrander EA, Jong PM, Rine J, et al. Construction of small insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(8): 3419-3423.
- [11] Karagyozov L, Kalcheva ID, Chapman VM.

- Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(16): 3911–3912.
- [12] Kandpal RP, Kandpal G, Weissman SM. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(1): 88–92.
- [13] Fisher PJ, Gardner RC, Richardson TE. Single locus microsatellites isolated using 5'-anchored PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(21): 4369–4371.
- [14] Lian CL, Zhou ZH, Hogetsu T. A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of inter-simple sequence repeat (ISSR)[J]. *Journal of Plant Research*, 2001, 114(3): 381–385.
- [15] Zhou Z, Miwa M, Hogetsu T. Polymorphism of simple sequence repeats reveals gene flow within and between ectomycorrhizal *Suillus grevillei* populations[J]. *New Phytologist*, 2001, 149(2): 339–348.
- [16] Foulongne-Oriol M, Spataro C, Savoie JM. Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in the white button mushroom *Agaricus bisporus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(6): 1125–1135.
- [17] Rosa VD, Cappuccio I, Fanelli C, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in two basidiomycete species: *Pleurotus eryngii* and *P. ferulae*[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(2): 271–273.
- [18] Kretzer AM, Dunham S, Molina R, et al. Microsatellite markers reveal the below ground distribution of genets in two species of *Rhizopogon* forming tuberculate ectomycorrhizas on Douglas fir[J]. *New Phytologist*, 2003, 161(1): 313–320.
- [19] Jany JL, Bousquet J, Gagné A, et al. Simple sequence repeat (SSR) markers in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for environmental monitoring of introduced strains and molecular ecology applications[J]. *Mycological Research*, 2006, 110(1): 51–59.
- [20] Ma KH, Lee GA, Lee SY, et al. Development and characterization of new microsatellite markers for the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*)[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(9): 851–857.
- [21] Foulongne-Oriol M, Spataro C, Moinard M, et al. Development of polymorphic microsatellite markers issued from pyrosequencing technology for the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 334(2): 119–126.
- [22] Malausa T, Gilles A, Meglécz E, et al. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2011, 11(4): 638–644.
- [23] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(1): 1–16.
- [24] Rubini A, Paolocci F, Riccioni C, et al. Genetic and phylogeographic structures of the symbiotic fungus *Tuber magnatum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6584–6589.
- [25] Rubini A, Topini F, Riccioni C, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in white truffle (*Tuber magnatum*)[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(1): 116–118.
- [26] Zhang RY, Hu DD, Zhang JX, et al. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for the mushroom *Flammulina velutipes*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 110(3): 273–275.
- [27] Zhang RY, Hu DD, Gu JG, et al. Development of SSR markers for typing cultivars in the mushroom *Auricularia auricula-judae*[J]. *Mycological Progress*, 2012, 11(2): 587–592.
- [28] 张瑞颖, 胡丹丹, 左雪梅, 等. 食用菌 SSR 序列开发策略研究进展[J]. *菌物研究*, 2010, 8(4): 239–244.
- [29] Kanchanaprayudh J, Lian C, Zhou Z, et al. Polymorphic microsatellite markers of a *Pisolithus* sp. from a *Eucalyptus* plantation[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2(3): 263–264.
- [30] Lian CL, Hogetsu T, Matsushita N, et al.

- Development of microsatellite markers from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*, by an ISSR-suppression-PCR method[J]. Mycorrhiza, 2003, 13(1): 27–31.
- [31] Donges K, Schlobinski D, Cremer E, et al. Six newly developed microsatellite markers of *Laccaria amethystina*, using an improved CSSR approach[J]. Mycological Progress, 2008, 7(4): 285–290.
- [32] Wadud MA, Lian CL, Nara K, et al. Development of microsatellite markers from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystina*, by a dual-suppression-PCR technique[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 130–132.
- [33] Kikuchi K, Matsushita N, Suzuki K. Development of SSR markers from an ectomycorrhizal fungus, *Suillus bovinus*[J]. Mycoscience, 2007, 48(4): 255–258.
- [34] Jany JL, Bousquet J, Khasa DP. Microsatellite markers for *Hebeloma* species developed from expressed sequence tags in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*[J]. Molecular Ecology Notes, 2003, 3(4): 659–661.
- [35] Murat C, Riccioni C, Belfiori B, et al. Distribution and localization of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new molecular markers[J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48(6): 592–601.
- [36] 刘林, 李成云, 杨静, 等. 灰盖鬼伞基因组中微卫星序列的组成[J]. 西南农业学报, 2006, 19(1): 131–135.
- [37] 刘春滢, 李南羿, 张玉琼. 香菇 EST-SSR 标记的开发及应用[J]. 食用菌学报, 2010, 17(2): 1–6.
- [38] 忻雅, 阮松林, 王世恒, 等. 基于 RAPD 和 EST-SSR 标记的秀珍菇菌株聚类分析[J]. 食用菌学报, 2008, 15(4): 20–25.
- [39] 管俊娇, 虞泓, 解云峰, 等. 虫草属 EST-SSR 标记系统的建立研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1711–1717.
- [40] Vincenot L, Nara K, Sthultz C, et al. Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* complex[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(2): 281–299.
- [41] 秦莲花, 张红, 陈明杰, 等. 微卫星(TATG)_n 基序在香菇菌种中的验证[J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 474–478.
- [42] 董岩, 陈辉, 赵明文, 等. 真姬菇栽培菌株的 ITS 和 SSR 分析[J]. 上海农业学报, 2009, 25(3): 59–64.
- [43] Xiao Y, Liu W, Dai YH, et al. Using SSR markers to evaluate the genetic diversity of *Lentinula edodes*' natural germplasm in China[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(3): 527–536.
- [44] Moquet F, Desmerger C, Mamoun M, et al. A quantitative trait locus of *Agaricus bisporus* resistance to *Pseudomonas tolaasii* is closely linked to natural cap color[J]. Fungal Genetics and Biology, 1999, 28(1): 34–42.
- [45] Labbé J, Zhang X, Yin T, et al. A genetic linkage map for the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and its alignment to the whole-genome sequence assemblies[J]. New Phytologist, 2008, 180(2): 316–328.
- [46] Larraya LM, Alfonso M, Antonio G, et al. Mapping of genomic regions (quantitative trait loci) controlling production and quality in industrial cultures of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3617–3625.
- [47] 许占伍, 陈辉, 冯志勇, 等. SSR 特异标记在真姬菇中的可传递性[J]. 上海农业学报, 2010, 26(2): 42–45.
- [48] 邓旺秋, 杨小兵, 李泰辉, 等. 广东省香菇栽培菌株 RAPD 多态性分析[J]. 食用菌学报, 2004, 11(1): 7–11.
- [49] 邓旺秋, 杨小兵, 李泰辉, 等. 广东省草菇主要栽培菌株 RAPD 多态性分析[J]. 食用菌学报, 2004, 11(3): 1–6.
- [50] 黄龙华, 吴清平, 杨小兵, 等. 基于 ITS 序列分析探讨我国栽培凤尾菇的分类地位[J]. 食用菌学报, 2009, 16(2): 30–35.