

研究报告

## 无柄灵芝遗传多样性的 SRAP、ITS、TEF1- $\alpha$ 和 LSU 分析

谭秀梅<sup>1,2</sup> 阿地力·沙塔尔<sup>2</sup> 朴春根<sup>1</sup> 薛寒<sup>1</sup> 郭民伟<sup>1</sup> 汪来发<sup>1</sup> 李永<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所 中国 北京 100091)

(2. 新疆农业大学林学与园艺学院 新疆 乌鲁木齐 830052)

**摘要:**【目的】研究来自我国不同地区的 45 株无柄灵芝菌株的遗传多样性。【方法】利用 ITS、TEF1- $\alpha$  和 LSU 多基因分析及 SRAP 分子标记两种方法, 对供试无柄灵芝菌株进行聚类分析和遗传多样性研究。【结果】筛选出 8 对 SRAP 引物共扩增出 95 条条带, 其中具有多态性条带 79 条, 平均多态性比例为 82.4%, 多态性信息含量(PIC)变幅在 0.28–0.43, 平均为 0.38。ITS、TEF1- $\alpha$  和 LSU 多基因序列分析结果显示, 同一地域的部分菌株聚在一起, 亲缘关系较近, 而地域相隔较远的部分菌株也聚在同一个进化支上, 其亲缘关系也很近, 这与 SRAP 聚类分析结果相吻合。【结论】无柄灵芝菌株遗传多样性较为丰富, 其遗传相似性与地理分布存在一定的相关性, ITS、TEF1- $\alpha$ 、LSU 基因及多基因分析更适合无柄灵芝分类鉴定, 而 SRAP 分子标记更适合于无柄灵芝遗传多样性分析。

**关键词:** 无柄灵芝, SRAP, ITS, TEF1- $\alpha$ , LSU, 遗传多样性

## Genetic diversity of *Ganoderma resinaceum* by SRAP, ITS, TEF1- $\alpha$ and LSU markers

TAN Xiu-Mei<sup>1,2</sup> ADIL·Sattar<sup>2</sup> PIAO Chun-Gen<sup>1</sup> XUE Han<sup>1</sup> GUO Min-Wei<sup>1</sup>  
WANG Lai-Fa<sup>1</sup> LI Yong<sup>1\*</sup>

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

(2. College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

**Abstract:** [Objective] Genetic diversity and relationship of 45 *Ganoderma resinaceum* strains from different areas in China were analyzed. [Methods] We studied clustering analysis and genetic diversity of these isolates using multi-gene analysis with ITS, TEF1- $\alpha$ , LSU sequences and SRAP technique. [Results] 8 pairs of primers on 45 strains were selected and amplified using PCR-SRAP system, and 95 fragments were amplified, the number of polymorphic bands was 79, the average polymorphic rate was 82.4%. The PIC (polymorphism information content) value of these markers varied from 0.28 to 0.43, averaging 0.38. The results of multi-gene analysis with ITS, TEF1- $\alpha$ , LSU sequences and SRAP technique showed that part of the strains from the same area were clustered with each other, their

**Foundation item:** National Infrastructure of Microbial Resources of China (No. NIMR-2016-7)

\*Corresponding author: Tel: 86-10-62889587; Fax: 86-10-62884972; E-mail: lyx78@126.com

Received: November 16, 2015; Accepted: August 01, 2016; Published online (www.cnki.net): September 30, 2016  
基金项目: 国家微生物资源平台项目(No. NIMR-2016-7)

\*通讯作者: Tel: 86-10-62889587; Fax: 86-10-62884972; E-mail: lyx78@126.com

收稿日期: 2015-11-16; 接受日期: 2016-08-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-09-30

kinship was close, and some strains with large gaps about the geographical distribution were also clustered in the same phylogenetic tree branch, their genetic relationship may also be relatively close, the result above was consistent with SRAP clustering analysis. **[Conclusion]** The genetic diversity of 45 strains was relatively abundant, and it had some correlation between genetic similarity and geographical distribution. ITS, TEF1- $\alpha$  and LSU sequences analysis and multi-gene analysis were more useful for classification and identification of *Ganoderma resinaceum*, and SRAP technique was more suitable for the genetic diversity analysis of *Ganoderma resinaceum*.

**Keywords:** *Ganoderma resinaceum*, SRAP, ITS, TEF1- $\alpha$ , LSU, Genetic diversity

无柄灵芝(*Ganoderma resinaceum*)作为灵芝属的其中一个种,与赤芝、紫芝一样,长期被用于预防和治疗各类疾病<sup>[1]</sup>。有研究记载无柄灵芝的提取物具有重要的抑菌活性和抗氧化作用<sup>[2]</sup>。由于自然条件的不断改变,使得无柄灵芝的遗传背景变得越来越复杂,因此对其遗传关系的研究显得尤为重要,也为将来无柄灵芝实现大规模的育种栽培提供便利和参考。

近年来,随着分子生物学的迅速发展,越来越多的分子标记技术被日益广泛地应用于群体遗传多样性研究中。目前分子标记技术主要有 RFLP、RAPD、ISSR、AFLP、SRAP 等。在众多的分子标记中,相关序列扩增多态性(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是一种新型的基于 PCR 技术的第三代分子标记技术<sup>[3]</sup>,由 Li 等发展而来,在遗传图谱构建和遗传多样性分析等方面已经被成功应用<sup>[4-6]</sup>。ITS (Internal transcribed spacer)是位于核糖体 DNA (rDNA)上的高度变异区,显示属内物种间和种内的遗传变异,已经成为属内种间系统发育、种间变异和遗传多样性分析的重要分子标记<sup>[7-9]</sup>。翻译延伸因子 TEF1- $\alpha$  在真菌的分类鉴定等系统学研究中已得到应用<sup>[10]</sup>。核糖体大亚基 DNA (Large ribosomal subunit gene, nrDNA-LSU)也是位于核糖体 DNA 上的高变区,能够反映一个属、亲缘关系较近的种或一个种及其种群之间的进化关系<sup>[11-16]</sup>。分子标记技术在食药菌遗传分析中已获广泛应用,但对于无柄灵芝分子标记的研究还较少。本研究应用 ITS、TEF1- $\alpha$  和 LSU 多基因分析及 SRAP 标记对 45 个无柄灵芝供试菌株进行遗传多样性分析,具有一定的意义,以为无柄灵芝遗

传学的进一步研究提供参考和指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

45 个无柄灵芝菌株源自不同地区(表 1),由中国林业微生物菌种保藏管理中心(CFCC)保藏并提供。

### 1.2 菌丝体培养和基因组 DNA 提取

将供试菌株接种到常规 PDA 斜面培养基<sup>[17]</sup>, 25 °C 培养 7 d, 得到菌丝备用。挑取少量菌丝,利用 CTAB 法提取基因组 DNA。并将所提取的 DNA 样品在 1%琼脂糖凝胶上进行质量和浓度检测,凝胶成像系统拍照记录。

### 1.3 扩增体系及程序

**1.3.1 SRAP 扩增体系及程序:** 按照 Li 和 Quiros (2001)设计 SRAP 引物序列,合成 10 个上游引物和 11 个下游引物(表 2),送上海英潍捷基贸易有限公司进行合成; 2×Power Taq PCR Master Mix (包含 dNTP、Taq 酶、缓冲液)由北京博迈德基因技术有限公司提供。

SRAP 扩增体系为 25  $\mu$ L, 含 12.5  $\mu$ L 2×Power Taq PCR Master Mix, 9.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 参照 Liu 等<sup>[18]</sup>方法。扩增程序为: 94 °C 5 min ;94 °C 1 min ,35 °C 1 min , 72 °C 1 min , 5 个循环; 94 °C 1 min , 50 °C 1min , 72 °C 1 min , 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统拍照保存。

**1.3.2 ITS 扩增体系及程序:** ITS 引物 ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4 : 5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3'。

表 1 供试材料及来源  
Table 1 The tested strains and their locations

编号 No.	菌株 Strain	来源地 Site	来源 Origin	编号 No.	菌株 Strain	来源地 Site	来源 Origin
1	C28	云南	中国林科院亚林所	24	C1	安徽	东北林业大学
2	C29		中国林科院亚林所	25	C33		四川农业大学
3	C30		中国林科院亚林所	26	C6	湖北	中国林科院林业所
4	C35		中国林科院亚林所	27	C2	贵州	东北林业大学
5	C36		中国林科院亚林所	28	C3	黑龙江	东北林业大学
6	C37		中国林科院亚林所	29	C4		东北林业大学
7	C38		中国林科院亚林所	30	C5		丹东林科所
8	C15	四川	四川农业大学	31	C7	吉林	北京农林科学院
9	C16		四川农业大学	32	C8		北京农林科学院
10	C17		四川农业大学	33	C9	江苏	中国林科院亚林所
11	C18		四川农业大学	34	C10		中国林科院亚林所
12	C19		四川农业大学	35	C11		中国林科院亚林所
13	C20		四川农业大学	36	C12	辽宁	中国林科院亚林所
14	C21		四川农业大学	37	C13	陕西	中国林科院亚林所
15	C22		四川农业大学	38	C14		中国林科院亚林所
16	C23		四川农业大学	39	C39	浙江	中国林科院林业所
17	C24		四川农业大学	40	C40		中国林科院林业所
18	C25		四川农业大学	41	C41		中国林科院林业所
19	C26		四川农业大学	42	C42		中国林科院林业所
20	C27		四川农业大学	43	C43		中国林科院林业所
21	C31		四川农业大学	44	C44		中国林科院林业所
22	C32		四川农业大学	45	C45		中国林科院林业所
23	C34		四川农业大学				

表 2 SRAP 扩增名称及序列  
Table 2 Primers of SRAP employed and their sequence

上游引物 Forward primer	序列 Sequence (5'→3')	长度 Size (bp)
上游引物 Forward primer Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	17
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	17
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	17
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	17
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	17
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	17
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	17
Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	17
Me9	TGAGTCCAAACCGGTGT	17
Me10	TGAGTCCAAACCGGTCA	17
下游引物 Reverse primer Em1	GACTGCGTACGAATTAAT	18
Em2	GACTGCGTACGAATTTGC	18
Em3	GACTGCGTACGAATTGAC	18
Em4	GACTGCGTACGAATTTGA	18
Em5	GACTGCGTACGAATTAAC	18
Em6	GACTGCGTACGAATTGCA	18
Em7	GACTGCGTACGAATTCAA	18
Em8	GACTGCGTACGAATTCTG	18
Em9	GACTGCGTACGAATTCGA	18
Em10	GACTGCGTACGAATTCAG	18
Em11	GACTGCGTACGAATTCCA	18

ITS-PCR 扩增体系与 SRAP 扩增体系相同, 扩增程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 将扩增产物送至上海立菲生物技术有限公司测序。

**1.3.3 TEF1- $\alpha$  扩增体系及程序:** TEF1- $\alpha$  引物 EF1-983F: 5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3'; 引物 EF1-2218R: 5'-ATGACACCRACRGCRACRG TYTG-3'。

TEF1- $\alpha$ -PCR 扩增体系同 SRAP 扩增体系, 扩增程序为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1 min, 39 个循环; 72 °C 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 将 PCR 产物送至上海生工生物工程技术有限公司测序。

**1.3.4 LSU 扩增体系及程序:** LSU 引物 LROR: 5'-ACCCGCTGAACCTAAGC-3'; LR7: 5'-TACTAC CACCAAGATCT-3'。

LSU-PCR 扩增体系同 SRAP 扩增体系, 扩增程序为: 94 °C 1 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 将 PCR 产物送至上海生工生物工程技术有限公司测序。

## 1.4 数据统计与分析

**1.4.1 SRAP 数据统计与分析:** 电泳图谱中每个 DNA 样品的扩增条带数均按照二元数字矩阵进行统计, 有带的记为 1, 无带的记为 0。应用 POPGENE 32 软件在假定种群处于温迪-哈伯格(Hard-Wenber)平衡的前提下, 对无柄灵芝居群进行 Nei's (1978) 遗传距离分析。利用 NTSYS-pc (Version 2.10) 软件对 45 个无柄灵芝菌株进行聚类分析并构建系统聚类图<sup>[19]</sup>。

**1.4.2 ITS、LSU 和 TEF1- $\alpha$  数据分析:** 应用 MEGA 5.2 软件, 将测序获得的 45 个无柄灵芝菌株的 ITS、LSU、TEF1- $\alpha$  以及 ITS+TEF1- $\alpha$ +LSU 序列分别进行多序列完全比对, 去掉两端差异序列, 利用 Kimura-2 遗传距离模型计算, 运行 1 000 次 Bootstrap 分别构建获得系统发育树状图<sup>[20]</sup>, 其中树图中的外群均来自于 GenBank。

## 2 结果与分析

### 2.1 多态性分析

在 SRAP 标记体系中, 110 对引物经过筛选后得到 8 对扩增条带清晰、多态性丰富、稳定性好的引物, 共扩增出 95 条谱带, 其中多态性谱带数为 79 条, 占总带数的比例为 83.2%, 平均每对引物所扩增条带数为 12 条, 平均每对引物扩增出多态性条带 10 条, 平均多态性比例为 82.4%。所采用的 8 对 SRAP 标记在 45 个菌株中均具有明显的多态性, 但从每个标记中分析得到的多态信息含量有所差异。SRAP 各标记的 PIC 变幅为 0.28–0.43, 其中多态信息含量最高的引物组合为 Me3/Em1, PIC 值为 0.43; 而多态信息含量最低的引物组合为 Me2/Em5, PIC 值为 0.28。平均 PIC 值为 0.38, 可以看出供试菌株具有较为丰富的遗传多样性, 同时也说明 SRAP 标记能够较好地用于无柄灵芝菌株遗传多样性分析(表 3)。

### 2.2 45 个无柄灵芝菌株的聚类分析

基于 SRAP 标记所得到的系统发育树(图 1)可以看出, 在相似系数为 0.72 水平上, SRAP 将 45 个无柄灵芝菌株分为了两大类; 而在相似系数为 0.74 水平上, 45 个菌株被分为了三大类, 其中一类共包括 4 个菌株, 分别为 C25、C27、C31 和 C26,

表 3 不同 SRAP 引物对供试无柄灵芝菌株的扩增结果  
Table 3 Molecular markers produced using different SRAP primers in the strains of *G. resinaceum* strains studied

引物组合 Primer combinations	扩增总 带数 Total numbers of bands	多态性 带数 Polymorphic bands	多态性位 点百分率 Polymorphism (%)	PIC
Me2/Em5	12	8	66.67	0.28
Me3/Em1	16	15	93.75	0.43
Me3/Em6	15	13	86.67	0.39
Me4/Em10	9	7	77.78	0.36
Me10/Em4	12	10	83.33	0.42
Me10/Em8	10	8	80.00	0.36
Me10/Em10	11	10	90.90	0.40
Me10/Em11	10	8	80.00	0.38
$\Sigma$	95	79	659.10	
$\bar{x}$	11.88	9.88	82.39	0.38

其采集地同为四川;在系数为 0.85 水平上,除菌株 C43 外,采自四川的菌株 C24 同采自云南的 3 株菌 C28、C30、C35 聚在一个分支上。此外,在相似系数大于 0.88 水平时,采自安徽的菌株 C1 和 C33、采自黑龙江的菌株 C3 和 C4,以及采自四川的菌株 C18 和 C19 分别两两聚为一支;在 0.96 水平时,45 个菌株被分为 44 个类群,其中有 43 个菌株都可单独分出,只有 C42 和 C45 未能分出,采集地均为浙江。在图 2 中,45 个菌株被分成了 4 个分支,但是

其进化支形状与 SRAP 进化树不同,其中除 C40 (浙江)外,采自四川的菌株 C17、C25 和 C31 与采自云南的菌株 C37 聚为一类,亲缘关系较近。图 3 与图 4 两个系统发育树中,45 个供试菌株均聚为一个分支,菌株间未被分开。从图 5 可以看出,45 个菌株被分为 2 大类群,其中一个类群中,除 C40 外,其它 4 株为 C16 和 C17、C29 和 C37,采集地分别为邻近的四川和云南;此外,另一类群中,C10 和 C44 聚在一起,分别采自江苏和浙江。

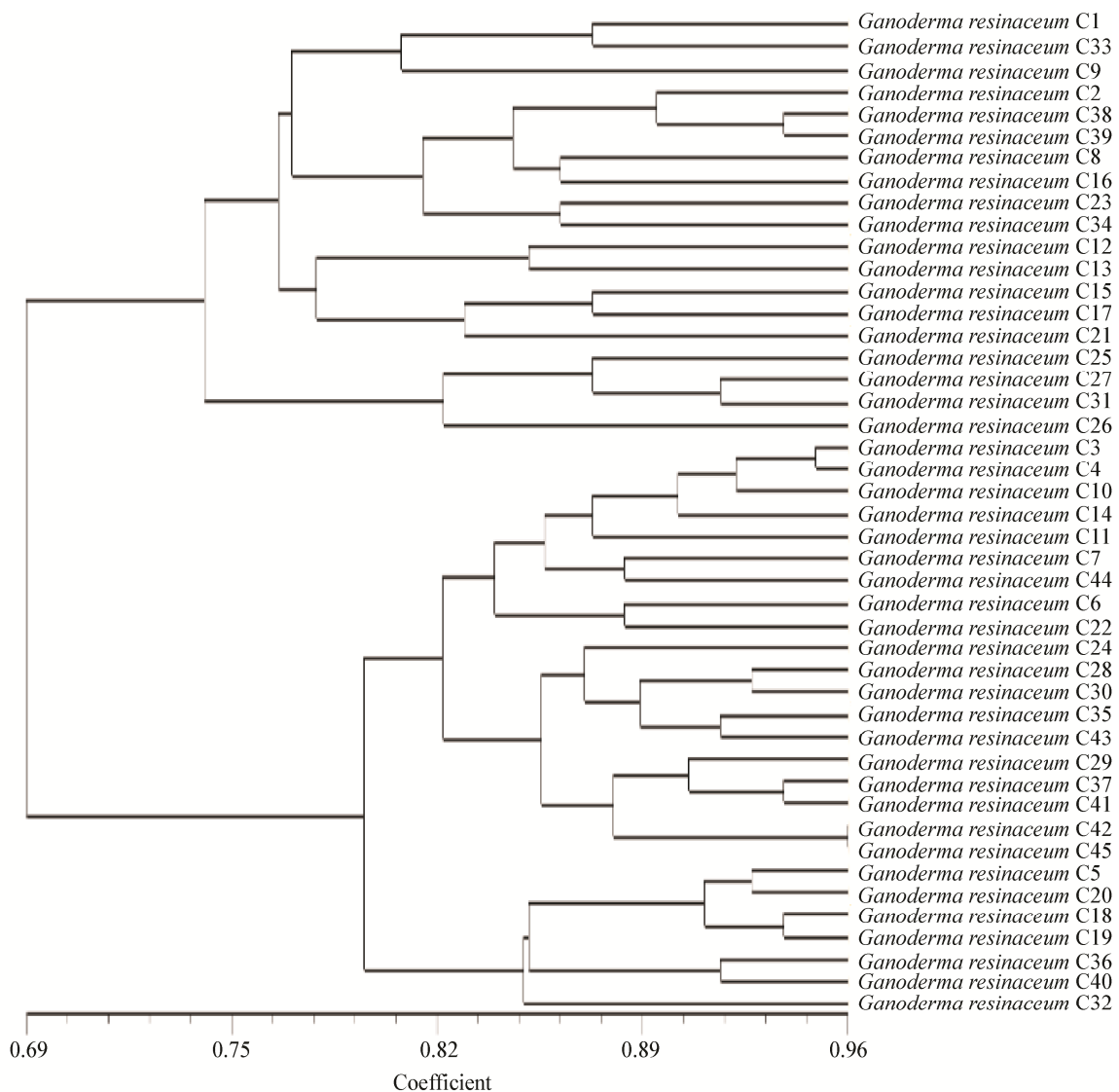


图 1 基于 SRAP 标记构建的无柄灵芝菌株系统发育树

Figure 1 Phylogenetic dendrogram of *G. resinaceum* strains based on SRAP markers

注:标尺长度代表相似系数。

Note: Scale length represented similarity coefficient.

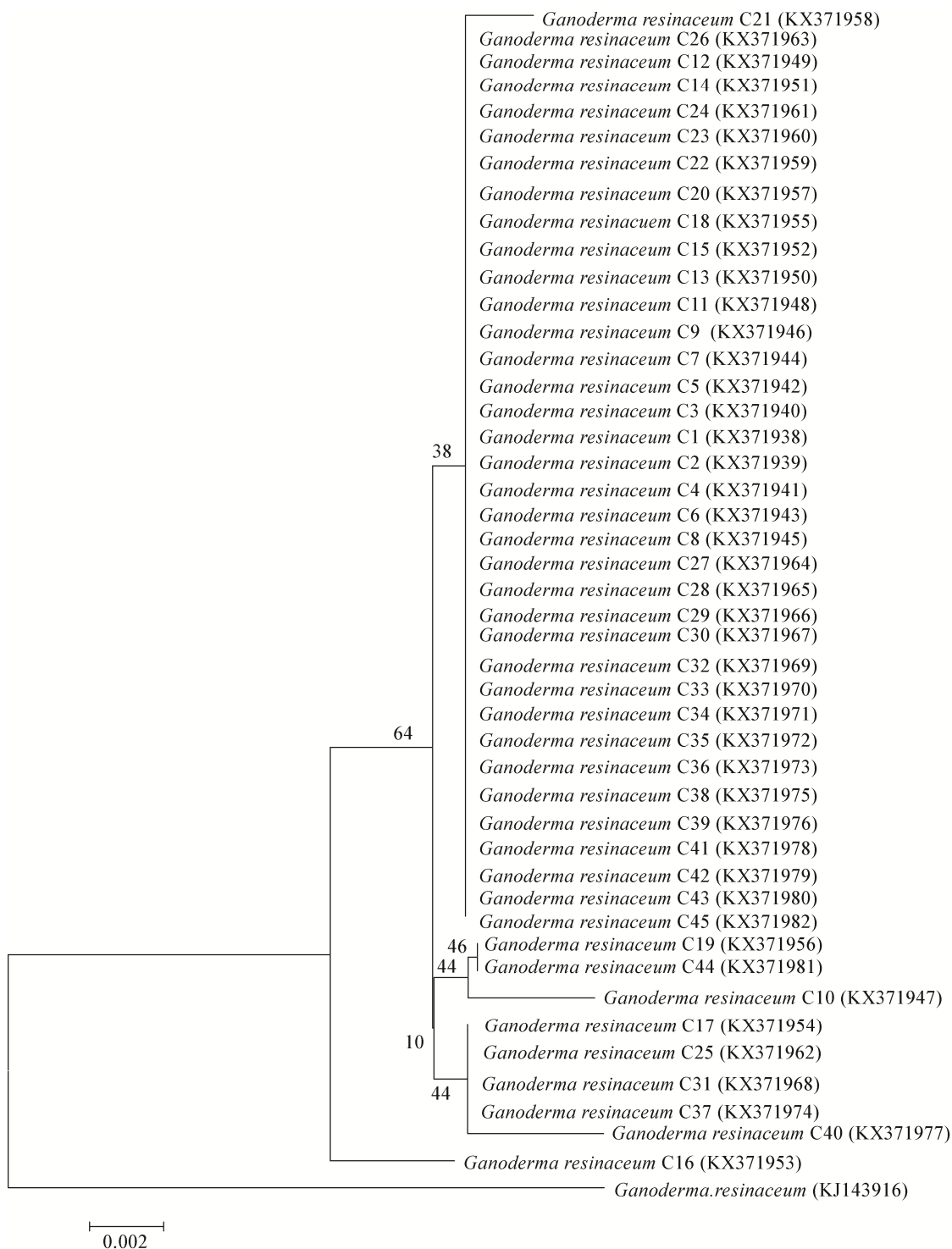


图 2 基于 ITS 序列信息构建的无柄灵芝菌株系统发育树

Figure 2 Phylogenetic dendrogram of *G. resinaceum* strains based on ITS nucleotide sequence

注：括号内为 GenBank 登录号；系统树分支点处的数字为系统树的自展值(1 000 次重复)；标尺长度代表遗传距离。

Note: GenBank accession numbers are shown in the parentheses. The numbers on the branch points of the phylogenetic tree represented bootstrap values of the tree (1 000 replicates); Scale length represented genetic distance.

从系统发育树中也可以看出, 不同来源地的无柄灵芝菌株也聚在同一个进化支上。如图 1 中, 菌株 C38 (云南)和 C39 (浙江)、菌株 C37 (云南)和 C41 (浙江)、菌株 C36 (云南)和 C40 (浙江)以及菌株 C5 (黑龙江)和 C20 (四川)分别两两聚在一起, 而这些

菌株彼此间地域分布相隔甚远。从图 2 中可以看出, 采自四川的菌株 C19 与采自浙江的菌株 C44 未能分出, 其亲缘关系极为接近。不同地域来源的无柄灵芝聚在一起, 可能是由于菌株原始提供者提供了错误信息。



图 3 基于 LSU 序列信息构建的无柄灵芝菌株系统发育树

Figure 3 Phylogenetic dendrogram of *G. resinaceum* strains based on LSU nucleotide sequence

注: 括号内为 GenBank 登录号; 标尺长度代表遗传距离。

Note: GenBank accession numbers are shown in the parentheses; Scale length represented genetic distance.

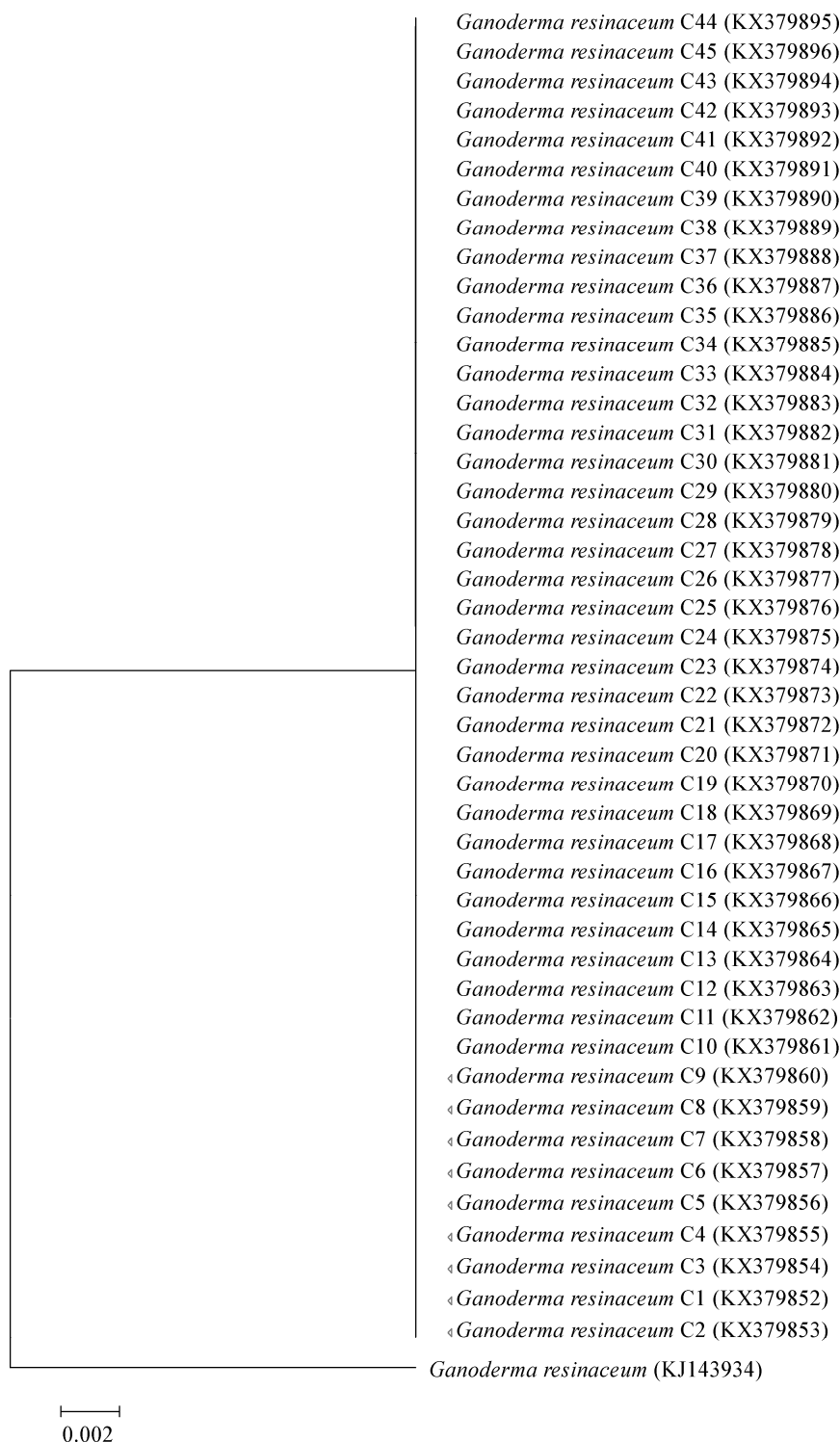


图 4 基于 TEF1- $\alpha$  序列信息构建的无柄灵芝菌株系统发育树

Figure 4 Phylogenetic dendrogram of *G. resinaceum* strains based on TEF1- $\alpha$  nucleotide sequence

注：括号内为 GenBank 登录号；标尺长度代表遗传距离。

Note: GenBank accession numbers are shown in the parentheses; Scale length represented genetic distance.



2.3 无柄灵芝菌株居群间的遗传距离分析

POPGENE 分析结果表明, 45 个无柄灵芝菌株间的 Nei's (1978) 遗传距离变化范围为 0.376–0.035, 其中云南和四川两居群之间的遗传距离最小 ( $D=0.035$ ), 遗传相似度最高; 其次为安徽和江苏 ( $D=0.046$ )、黑龙江和吉林 ( $D=0.125$ )。这些居群之间的地理位置比较接近, 气候类型大致相似, 彼此之

间基因交流的可能性较大, 因而保持着较小的遗传距离。而黑龙江和贵州两个居群间的遗传距离最大 ( $D=0.376$ ), 遗传相似度最低; 其次为辽宁和云南 ( $D=0.368$ )、安徽和云南 ( $D=0.361$ )。可能是因为这些居群间地理位置相隔较远, 彼此间生境差异较大, 基因交流的可能性相对较小, 因而在进化中形成了较大的遗传距离。

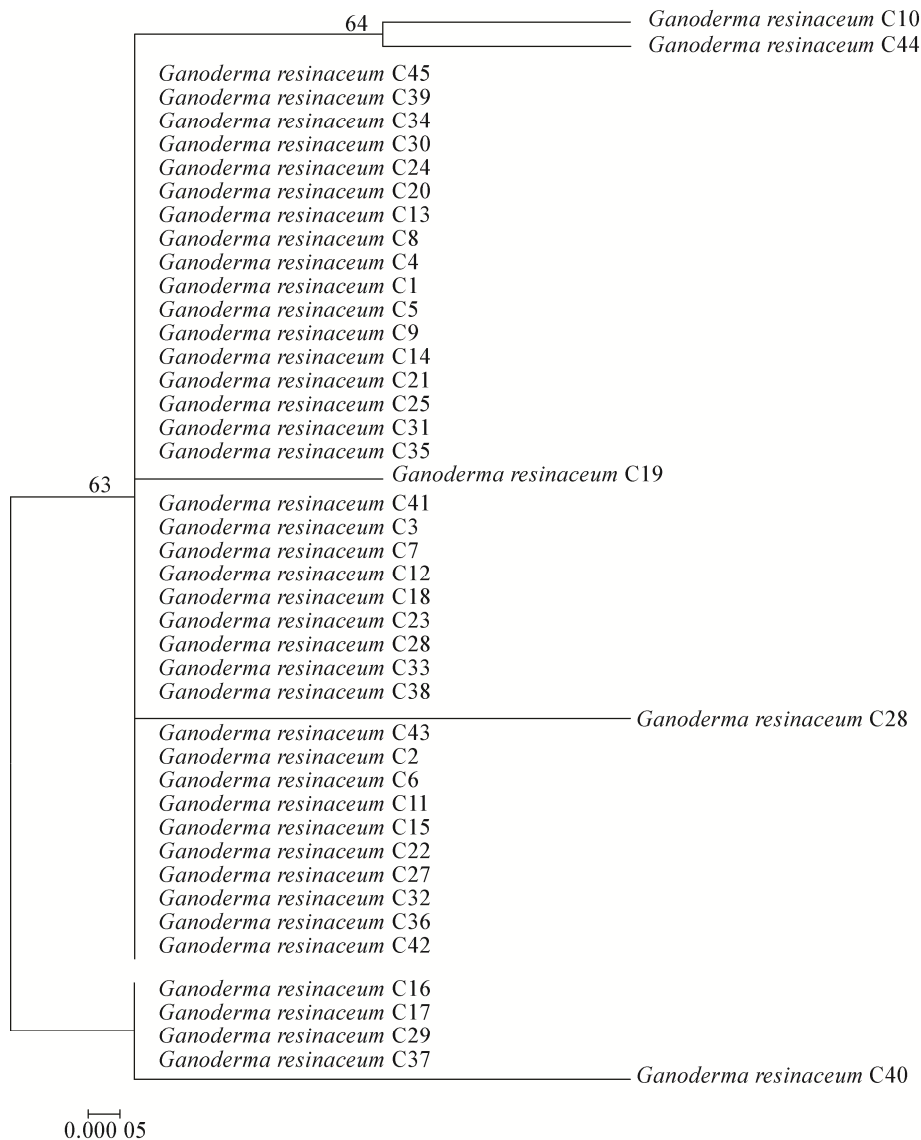


图 5 基于 ITS+TEF1- $\alpha$ +LSU 序列信息构建的无柄灵芝菌株系统发育树

Figure 5 Phylogenetic dendrogram of *G. resinaceum* strains based on ITS+TEF1- $\alpha$ +LSU nucleotide sequence

注: 系统树分支点处的数字代表系统树的自展值(1 000 次重复); 标尺长度代表遗传距离。

Note: The numbers on the branch points of the phylogenetic tree represented bootstrap values of the tree (1 000 replicates); Scale length represented genetic distance.

### 3 讨论

本研究应用 ITS、TEF1- $\alpha$ 、LSU 和 SRAP 标记技术对来自我国不同地区的无柄灵芝菌株进行遗传多样性分析。筛选出的 8 对 SRAP 引物共扩增出 95 条条带,多态性条带 79 条,平均多态性比例为 82.4%,有效地反映了供试无柄灵芝材料间丰富的遗传多样性。ITS、TEF1- $\alpha$ 、LSU 序列分析和 SRAP 标记得到的聚类结果相似,同一地域的部分菌株聚在一起,亲缘关系较近,说明供试菌株的遗传多样性与地域分布有关;个别不同来源地的无柄灵芝菌株也聚在同一个进化支上,可能是由种质资源的信息有误所致。通过对居群两两间的 Nei's (1978)遗传距离进行分析,也表明无柄灵芝遗传距离与地理分布存在一定的关系。

近年来,有多位学者致力于利用分子标记技术来探讨灵芝属真菌的系统发育和遗传分化等问题。Moncalvo 等<sup>[21-22]</sup>曾通过分析 ITS 和 LSU-D2 序列来探讨灵芝属菌株的系统发育关系,对灵芝属菌株的分类鉴定以及解决传统分类上的混乱具有重要意义。Hong 等<sup>[23]</sup>利用 mt SSU rDNA 对供试灵芝属菌株进行系统发育分析,取得了良好的成果。兰进等<sup>[24]</sup>、赵明文等<sup>[25]</sup>分别利用同工酶和 RAPD 技术对灵芝不同菌株进行分类鉴定,表明两种技术均适合于灵芝遗传关系研究。唐传红等<sup>[26]</sup>结合 RAPD 和酯酶同工酶技术对来自国内外的 10 个灵芝属代表菌株进行了遗传多样性分析,认为两种方法结合使用效果更好。Cao 等<sup>[10]</sup>利用 ITS、mt SSU、RPB1、RPB2 和 TEF1- $\alpha$  对灵芝菌株进行分类鉴定,澄清了灵芝属个别种之间的混淆。贾定洪等<sup>[20]</sup>、Zheng 等<sup>[27]</sup>分别利用 ITS 技术、ITS 和 RFLP 结合使用技术对灵芝菌株进行系统发育分析,得到了预期的结果。Zhang 等<sup>[28]</sup>通过 SRAP 标记技术对灵芝原生质体融合子进行鉴定,证明 SRAP 标记可以作为灵芝原生质体融合子鉴定研究的有效手段。然而,目前利用分子标记技术对无柄灵芝遗传多样性的研究尚少。本研究结合 ITS、TEF1- $\alpha$ 、LSU 多基因分析及 SRAP 分子标记技术对无柄灵芝遗传多样性进行分析,具

有一定的意义,以期在无柄灵芝遗传关系的进一步研究提供新的思路和有利参考。

有研究报道,尽管无柄灵芝(*G. resinaceum*)与灵芝(*G. lucidum*)在形态上存在一定的差异,但二者的亲缘关系十分接近,所以经常容易混淆<sup>[22,29-30]</sup>。灵芝属种类较多,在对灵芝属菌株的相关研究中,同名异物或同物异名的现象普遍存在,因此应当引起研究者的重视。本研究中所采用的 45 株无柄灵芝供试菌株通过 ITS、TEF1- $\alpha$  和 LSU 序列的鉴定分析,其遗传相似性均在 99.0%以上,且 45 个菌株在基于 ITS、TEF1- $\alpha$  和 LSU 序列分析的系统发育树中均聚为一个分支,可见本研究所采用的 45 株供试菌株为同一个物种。

ITS 标记在真菌的属内种间或种内群体的系统学研究中已广泛应用;而高变区 LSU rDNA 是进行各种水平分类的一个良好的分子标记,能够反映一个属、亲缘关系较近的种或一个种及其种群之间的进化关系;翻译延伸因子 TEF1- $\alpha$  在真菌的分类鉴定等系统学研究中已得到应用。但 ITS、TEF1- $\alpha$  和 LSU 等多基因分析可对灵芝属开展种类鉴定,因其仅是对一个或几个区域进行的检测,还存在一定的局限,而 SRAP 是对全基因组进行的检测,可以提供更为丰富的遗传信息<sup>[31]</sup>。因此,利用多基因分析及分子标记相结合的方法对供试菌株的遗传关系进行研究,通过相互验证能够得到更为可靠的结论。在本研究中,具有相同 ITS 序列、TEF1- $\alpha$  序列以及 LSU 序列的无柄灵芝菌株可以通过 SRAP 标记来进行区分。SRAP 标记能更好地对供试无柄灵芝菌株进行聚类分析,ITS+TEF1- $\alpha$ +LSU 序列分析和 ITS 序列分析方法也能区分部分菌株,TEF1- $\alpha$  和 LSU 序列分析方法未能将供试菌株分开。由此可见,SRAP 分子标记更适合于无柄灵芝遗传多样性研究,但其它分析方法也具有一定的参考价值。

### 参考文献

- [1] Peng XR. Study on the chemical constituents and bioactivities of *Ganoderma resinaceum* and *Ganoderma cochlear*[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan Agricultural University, 2012 (in Chinese)

- 彭惶蓉. 无柄灵芝与反柄紫芝的化学成分及生物活性研究[D]. 昆明: 云南农业大学硕士学位论文, 2012
- [2] Al-Fatimi M, Wurster M, Kreisel H, et al. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of selected basidiomycetes from Yemen[J]. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005, 60(10): 776-780
- [3] Li P, Zhan X, Que QM, et al. Genetic diversity and population structure of *Toona Ciliata* Roem. Based on sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers[J]. Forests, 2015, 6(4): 1094-1106
- [4] Li G, Quiros CF. 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
- [5] Budak H, Shearman RC, Parmaksiz I, et al. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(2): 328-334
- [6] Sun SJ, Gao W, Lin SQ, et al. Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(3): 537-543
- [7] Bunyard BA, Chaichuchote S, Nicholson MS, et al. Ribosomal DNA analysis for resolution of genotypic classes of *Pleurotus*[J]. Mycological Research, 1996, 100(2): 143-150
- [8] Dunham SM, O'dell TE, Molina R. Analysis of nr DNA sequences and microsatellite allele frequencies reveals a cryptic chanterelle species *Cantharellus cascadenis* sp. nov. from the American Pacific Northwest[J]. Mycological Research, 2003, 107(10): 1163-1177
- [9] Smith BJ, Sivasithamparan K. Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia[J]. Mycological Research, 2000, 104(8): 943-951
- [10] Cao Y, Wu SH, Dai YC. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom "Lingzhi"[J]. Fungal Diversity, 2012, 56(1): 49-62
- [11] Chen GF. Morphological and phylogenetic analysis and detection by fluorescent *in situ* hybridization of several red tide causative microalgae[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2007 (in Chinese)  
陈国福. 几种赤潮微藻的形态和系统进化分析及荧光原位杂交检测[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2007
- [12] Vilgalys R, Moncalvo JM, Liou S R, et al. Recent advances in molecular systematics of the genus *Pleurotus*[A]/Royse, DJ. Mushroom Biology and Mushroom Products[M]. University Park, PA, USA: Pennsylvania State University, 1996: 91-101
- [13] Thorn RG, Moncalvo JM, Reddy CA, et al. Phylogenetic analyses and the distribution of nematophagy support a monophyletic Pleurotaceae within the polyphyletic pleurotoid-lentinoid fungi[J]. Mycologia, 2000, 92(2): 241-252
- [14] Hibbett DS, Binder M. Evolution of complex fruiting-body morphologies in homobasidiomycetes[J]. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2002, 269(1504): 1963-1969
- [15] Moncalvo JM, Vilgalys R, Redhead SA, et al. One hundred and seventeen clades of euagarics[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2002, 23(3): 357-400
- [16] Li XL. Phylogenetic position of *Pleurotus calypratus* based on nrDNA—LSU and ITS sequences[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2005, 27(3): 67-71 (in Chinese)  
李雪玲. 贝盖侧耳的系统发育地位—基于 nrDNA-LSU 和 ITS 序列分析的研究[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(3): 67-71
- [17] Lin RB, Zhang H, Chen JC, et al. SRAP analysis of *Agaricus blazei* Murill cultivars[J]. Chinese Journal of Tropical crops, 2012, 33(3): 472-474 (in Chinese)
- 林戎斌, 张慧, 陈济琛, 等. 姬松茸种质资源多样性 SRAP 分析[J]. 热带作物学报, 2012, 33(3): 472-474
- [18] Liu N, Liu ZL, Gong GS, et al. Virulence structure of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and its genetic diversity by ISSR and SRAP profiling analyses[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130881
- [19] Zhang X, Li Q, Liu HJ, et al. Application of SRAP and ITS molecular markers in genetic diversity of wild *Auricularia auricula* in Daxing'anling area[J]. Heilongjiang Science, 2013, 4(4): 18-21 (in Chinese)  
张旭, 李倩, 刘华晶, 等. SRAP 和 ITS 分子标记在大兴安岭地区野生黑木耳遗传多样性上的应用[J]. 黑龙江科学, 2013, 4(4): 18-21
- [20] Jia DH, Wang B, Peng WH, et al. Analysis of ITS sequences in 4 wild *Ganoderma lucidum* strains[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2012, 25(4): 1414-1416 (in Chinese)  
贾定洪, 王波, 彭卫红, 等. 4 个野生灵芝菌株的 ITS 序列分析[J]. 西南农业学报, 2012, 25(4): 1414-1416
- [21] Moncalvo JM, Wang HH, Hseu RS. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences[J]. Mycologia, 1995, 87(2): 223-238
- [22] Moncalvo JM, Wang HF, Hseu RS. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters[J]. Mycological Research, 1995, 99(12): 1489-1499
- [23] Hong SG, Jung HS. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences[J]. Mycologia, 2004, 96(4): 742-755
- [24] Lan J, Xu JT, Wang QY, et al. Electrophoretic studies on esterase and peroxidase isozymes in *Ganoderma* sp.[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 1998, 33(12): 714-716 (in Chinese)  
兰进, 徐锦堂, 王秋颖, 等. 灵芝过氧化物同工酶和酯酶同工酶的研究[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(12): 714-716
- [25] Zhao MW, Chen MJ, Wang N, et al. Study on genetic relationship among some commercial strains of *Ganoderma*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2003, 26(3): 60-63 (in Chinese)  
赵明文, 陈明杰, 王南, 等. 灵芝生产用种的亲缘关系研究[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(3): 60-63
- [26] Tang CH, Zhang JS, Chen MJ, et al. Preliminary study on genetic diversity among ten strains of *Ganoderma*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2005, 28(2): 133-136 (in Chinese)  
唐传红, 张劲松, 陈明杰, 等. 灵芝属菌株遗传多样性的初步研究[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 133-136
- [27] Zheng LY, Jia DH, Fei XF, et al. An assessment of the genetic diversity within *Ganoderma* strains with AFLP and ITS PCR-RFLP[J]. Microbiological Research, 2009, 164(3): 312-321
- [28] Zhang HY, Fu LZ, Wu XQ, et al. Identification of protoplast fusion hybrids of *Ganoderma lucidum* by SRAP analysis[J]. Acta Edulis Fungi, 2009, 16(4): 5-9 (in Chinese)  
张红玉, 付立忠, 吴学谦, 等. 灵芝原生质体融合子的 SRAP 分子标记鉴定[J]. 食用菌学报, 2009, 16(4): 5-9
- [29] Steyaert RL. Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Leiden herbaria[J]. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 1972, 7(1): 55-118
- [30] Gilbertson RL, Ryvarden L. European Polypores[M]. Oslo: Synopsis Fungorum, 1993, 6: 743
- [31] Hseu RS, Wang HH, Wang HF, et al. Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(4): 1354-1363