

基于形态特征和 ITS 序列分析秦巴山区黑木耳主要栽培种的亲缘关系

王 进¹, 陈文强^{*1,2}, 邓百万^{1,2}, 彭 浩^{1,2}, 解修超^{1,2},
赵娜娜¹, 刘兆迪¹, 乔艳明¹, 张红涛¹

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723000)

摘要: 采用 CTAB 法提取黑木耳菌株的 DNA, 进行 PCR 扩增, 扩增产物进行测序。耳 2 和标准菌株 *Auricularia auricula-judae* HF-8 (GQ168492) 聚类在同一分支上; 耳 913 和标准菌株 *Auricularia auricula-judae* YBS-7 (GQ168503) 聚类在同一分支上, 且神农 A8 与新科、耳 2、耳 913 亲缘关系相对较远。耳 97-2 和标准菌株 *Auricularia auricula-judae* NW482 (EU520194) 聚类在同一分支上; 耳 268 和标准菌株 *Auricularia auricula-judae* NW491 (EU520160) 聚类在同一分支上, 且秦单 4# 与耳 97-2、耳 268 亲缘关系相对较远。新科、耳 2、耳 913、神农 A8 此 4 个菌种亲缘关系比较近; 耳 268、秦单 4#、耳 97-2 等 3 个菌种亲缘关系较近。通过黑木耳菌株的形态观察及 ITS 序列分析, 得到两株亲缘关系较远的优势菌株秦单 4# 和神农 A8。

关键词: 黑木耳; 菌丝; 生长速度; ITS 序列

中图分类号: TS 255.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)05—0535—07

Analysis of the Genetic Relationships of Main *Auricularia auricular* Cultispecies in Qinba Mountainous Area Based on ITS Sequence

WANG Jin¹, CHEN Wenqiang^{*1,2}, DENG Baiwan^{1,2}, PENG Hao^{1,2}, XIE Xiuchao^{1,2},
ZHAO Nana¹, LIU Zhaodi¹, QIAO Yanming¹, ZHANG Hongtao¹

(1. School of Biological Science and Engineering, Shanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China; 2. Shanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fung, Hanzhong 723001, China)

Abstract: Analyzing the genetic relationships of the main *Auricularia auricular* cultispecies in Qinba mountainous area by ITS sequence so as to lay a theoretical foundation to genetics and breeding. Using CTAB method to extract genomic DNA from the bacterial strain, *Auricularia auricular*, and amplifying and sequencing PCR products; *Auricularia auricula-judae* 2 and *Auricularia auricula-judae* HF-8 (GQ168492) were clustered in the same branch, *Auricularia auricula-judae* 913 and *Auricularia auricula-judae* YBS-7 (GQ168503) were clustered in the same

收稿日期: 2013-10-13

基金项目: 陕西理工学院创新基金项目 (SLGYCX1309)。

* 通信作者: 陈文强 (1956—), 男, 陕西洋县人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物资源的保护与利用方面的研究。

E-mail: wenqiangc@126.com

branch, but the genetic relationship between *Auricularia auricula*-judae Shennong A8 and the *Auricularia auricula*-judae 2, *Auricularia auricula*-judae 913 were relatively alienative. *Auricularia auricula*-judae 97-2, *Auricularia auricula*-judae NW482 (EU520194), the *Auricularia auricula*-judae 268 and *Auricularia auricula*-judae NW491 (EU520160) were clustered in the same branch. However the genetic relationships among *Auricularia auricula*-judae Qindan 4, *Auricularia auricula*-judae 97-2, *Auricularia auricula*-judae 268 were relatively alienative. The genetic relationships among *Auricularia auricula*-judae Xinke, *Auricularia auricula*-judae 2, *Auricularia auricula*-judae 913 and *Auricularia auricula*-judae Shennong A8 were close. However, the relationships between *Auricularia auricula*-judae 268, *Auricularia auricula*-judae Qindan 4[#] and *Auricularia auricula*-judae 97-2 were quite far. Through the morphologic and ITS analysis of *Auricularia auricular* strains, two dominant strains, *Auricularia auricula*-judae Qindan 4[#] and *Auricularia auricula*-judae Shennong A8, have alienative relationship. Our findings established a solid foundation to genetics and breeding.

Keywords: *Auricularia auricular*, mycelia, growth rate, ITS

黑木耳(*Auricularia auricular*), 俗称木耳, 属担子菌亚门(Basidiomycotina), 层菌纲(Hymenomycetes)、木耳目(Auriculariales)的一种典型的胶质真菌^[1]。其颜色淡褐、形似人耳, 主要含有蛋白质、脂肪、维生素和Ca、Fe、Zn、Mg、Mn及Cu等多种微量元素。其味甘性平, 具有益气强身、滋肾养胃和活血等功能^[2-3]。同时, 因为黑木耳中含有丰富的纤维素和一种特殊的植物胶质, 可助胃肠蠕动, 减少脂肪吸收, 是一种美容养生的绿色食品。由于秦巴山区气候温和湿润, 很适宜菌类的生长, 所产黑木耳以其质厚和肉嫩而深受人们喜爱。

目前, 国内外对黑木耳种质资源研究主要集中于栽培品种, 如Tang L.H.等利用ISSR和SRAP技术对国内的34个栽培品种进行遗传多样性分析, 聚类分析结果表明, 利用两种方法菌株可以分别聚类为4个和5个类群, 栽培菌株间遗传多样性比较丰富^[4]; 张介驰等利用ISSR技术对东北地区主栽的27个黑木耳菌株进行聚类分析, 相似水平在0.75时, 可将27个供试黑木耳菌株分为3个类群^[5]; 刘华晶等利用ITS序列对大兴安岭地区采集的14株野生黑木耳菌株和6株对照栽培种黑木耳菌株进行亲缘关系分析, 表明黑木耳ITS区(ITS1+5.8S+ITS2)信息位点比例达到52.1%, 遗传位点丰富, 证明ITS序列可以为黑木耳菌株的亲缘关系问题提供较强的证据^[6]。

ITS(Internal transcribed spacer)是核糖体rDNA

中介于18S与5.8S之间的ITS1、及5.8S与28S之间的ITS2的非编码转录间隔区, 进化速率较快且片段长度适中, 加上协调进化, 使得该片段在基因组不同重复单元间十分一致, 成为高等真菌属内种间及种群系统学研究的核基因标记^[7]。真菌的rDNA的ITS区段的保守性基本上表现为种内相对一致、种间差异比较明显, 这一特点使得ITS区段不仅适合于属内物种间或种内差异较明显的菌群间的系统发育关系分析, 而且非常适合于真菌物种的分子鉴定^[8]。许多学者利用不同物种中或同一物种不同菌株间ITS序列的差异来进行真菌系统发育或分类鉴定等方面的研究^[9-12]。

由于秦巴山区黑木耳主要栽培种的亲缘关系尚无相关研究报道, 黑木耳品系的种源关系不明确, 缺少适宜于地域栽培生长的黑木耳品种, 对于培育出适合秦巴山区栽培的优良高产菌株的难度较大。作者选取秦巴山区新科、耳268、秦单4[#]、耳2、耳913、神农A8、耳97-2等7个黑木耳主要栽培菌株, 对其菌丝生长速度、菌丝形态特征及其核糖体转录间隔区(ITS)进行序列分析, 并进一步对ITS序列进行核酸序列数据库GenBank同源性检索比对, 构建系统发育树, 以期为基于传统形态特征对秦巴山区7个黑木耳主要栽培菌株之间的亲缘关系提供分子依据, 为黑木耳优良菌种选育及建立种质资源库提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 新科、耳 268、秦单 4#、耳 2、耳 913、神农 A8、耳 97-2 共 7 株黑木耳栽培菌株;由陕西省资源生物重点实验室食药菌种保藏中心提供。

1.1.2 培养基 CPDA 培养基 马铃薯 200.00 g,葡萄糖 20.00 g, KH_2PO_4 5.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.00 g, VB_1 0.01 g,琼脂 18.00 g,加水至 1 000 mL,pH 自然。

1.1.3 主要试剂 2× Taq PCR Green Mix,ITS1,ITS4,模板 DNA,ddH₂O。

1.1.4 主要仪器与设备 恒温振荡器:ZHWY-210 2C,上海智诚分析仪器制造有限公司;超净工作台:SW-CJ-1F,苏州安泰空气技术有限公司;电子天平:BJ100M,上海精科天美科学仪器有限公司;立式圆形压力蒸气灭菌器:LS-B50L,上海医用核子仪器厂;人工气候箱:LRH-800-GS,韶关市明天环保仪器有限公司;恒温水浴锅:DZKW-S-4,惠州市新旭实业有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 配制 CPDA 培养基,分装试管,于 1.034×10^5 Pa 灭菌 30 min 后放置斜面,冷却后,7 个黑木耳菌株分别接于培养基上,28 ℃培养,待菌丝长满斜面后转入 4 ℃冰箱保存,备用。

1.2.2 菌丝生长速度的测定 配制 CPDA 培养基,于 1.034×10^5 Pa 灭菌 30 min,倒平皿,冷却后每个菌株种接 5 个平皿,28 ℃培养,记录菌丝生长速度,每一处理重复 5 次,对实验结果进行统计分析,用 LSD 比较差异显著性;观察菌丝形态、菌丝色泽及密度,并记录。

1.2.3 菌丝的显微观察 在光学显微镜下用 40 倍物镜,显微观察 7 个黑木耳菌株菌丝直径、菌丝分隔情况、菌丝锁状联合情况,并拍照进行记录。

1.2.4 液体发酵 CPDA 培养基去掉琼脂制备液体培养基,分装于 500 mL 三角瓶中,装液量 200 mL/瓶,于 1.034×10^5 Pa 灭菌 30 min,冷却后将活化的菌株接入液体培养基中^[13],静置 24 h 后,28 ℃、170 r/min 振荡培养。

1.2.5 菌丝体收集 28 ℃振荡培养 6~7 d,将培养好的菌丝体用纱布过滤,再用无菌水洗涤过滤 2~3 次,最后用滤纸吸干水分收集菌丝体。4 ℃冰箱保

存,备用。

1.2.6 DNA 的提取 菌丝体 DNA 的提取参照 CTAB 法^[14]。取 0.5 g 备用菌丝体,液氮研磨成粉状;加 600 μL CTAB,混匀;65 ℃水浴 1 h,每 20 分钟翻转一次;4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min;取上清液加 300 μL Tris 饱和酚,300 μL 氯仿-异戊醇(24:1),轻轻混匀,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min;取上清液加入 1/2 体积无水乙醇,-20 ℃保存 1 h,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min;弃上清液,加 75%乙醇洗 2 次(乙醇每次加 1 mL),4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,重复 2 次,弃上清液,晾干;加 ddH₂O 20 μL,溶解 DNA,-20 ℃保存备用。

1.2.7 ITS 序列扩增及检测 ITS 序列扩增引物为真菌通用引物 ITS1、ITS4(上海生物工程有限公司合成)^[15]。PCR 反应体系(25 μL):2× Taq PCR Green Mix 12 μL,ITS1 1 μL,ITS4 1 μL,模板 DNA 2 μL,ddH₂O 9 μL;PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 45 s,58 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,共 33 个循环;72 ℃延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物,用 1 g/dL 琼脂糖凝胶(TBE 缓冲液)电泳检测,于 Tanon 3500R 凝胶成像系统(中国 TANON 公司产品)拍照,记录电泳结果。

1.2.8 测序 PCR 产物测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.9 系统进化树的构建 通过前端引物与后端引物双向测序获得 ITS 的完整基因序列。用 ClustalW 软件对序列进行对位排列,然后手工适当校正,排列中产生的空位(gap)被处理为缺失(missing)。应用 Mega 5 软件包计算它们相互间的碱基差异,GenBank 数据库中进行 BLAST 搜索,搜索并下载得到相似度大于 99%的序列,使用 Kimura 双参数模型构建邻接系统发育树,利用自展法(Bootstrap,1 000 次重复)检验各分支的置信度。

2 结果与分析

2.1 黑木耳菌株菌丝的生长速度

黑木耳菌株于 CPDA 培养基中 28 ℃培养,记录菌丝生长速度。不同菌株菌丝生长速度见表 1、图 1。

表 1 和图 1 表明,黑木耳菌株秦单 4# 菌丝生长速度最快,为 6.200 mm;耳 268 菌丝生长速度最慢,为 4.300 mm;7 个黑木耳菌株菌丝的平均生长速度为 5.271 mm;耳 913、秦单 4# 的差异显著性小;耳 268 的差异显著性大。

表 1 黑木耳菌株菌丝的生长速度

Table 1 Mycelia growth rate in different *Auricularia auricular* strains

黑木耳品种	菌丝生长速度/(mm/d)					菌丝平均生长速度/(mm/d)		差异显著性
	1	2	3	4	5			
耳 2	5.500	5.000	5.500	6.500	5.500	5.600	b	B
耳 268	3.500	4.000	3.500	5.500	5.000	4.300	e	E
耳 97-2	4.500	5.500	4.500	4.500	6.000	5.000	c	C
神农 A8	4.500	5.500	5.000	5.000	6.000	5.200	c	C
新科	5.000	5.500	4.500	4.500	5.000	4.900	b	B
耳 913	5.500	6.000	6.000	5.500	5.500	5.700	a	A
秦单 4 [#]	6.000	6.500	6.000	6.500	6.000	6.200	a	A
X						5.271		

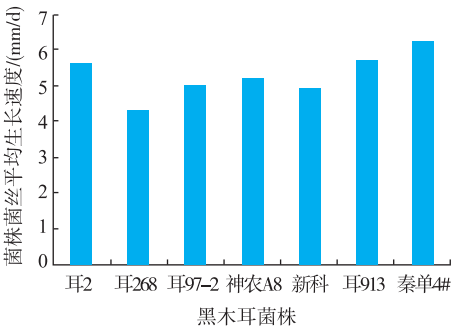


图 1 黑木耳菌株菌丝的生长速度

Fig. 1 Mycelia growth rate in different *Auricularia auricular* strains

2.2 黑木耳菌株菌丝的形态观察

黑木耳菌株于 CPDA 培养基中 28 ℃培养,观察菌丝的形态、色泽及菌丝密度并记录。结果见表 2。

表 2 黑木耳菌株菌丝的形态观察

Table 2 Mycelia morphology investigation in different *Auricularia auricular* strains

黑木耳品种	菌丝形态	菌丝色泽	菌丝密度
耳 2	完整	白色	浓密
耳 268	完整	白色	浓密
耳 97-2	不完整	灰白	较浓
神农 A8	完整	洁白	浓密
新科	完整	灰白	浓密
耳 913	完整	灰白	较浓
秦单 4 [#]	完整	灰白	浓密

表 2 表明,黑木耳菌种耳 97-2 菌丝边缘不完整,耳 2、耳 268、神农 A8、新科、耳 913、秦单 4[#] 菌丝边缘完整;神农 A8 菌丝洁白,耳 2、耳 268 菌丝呈白色,耳 97-2、新科、耳 913、秦单 4[#] 菌丝呈灰白色;耳 2、耳 268、神农 A8、新科、秦单 4[#] 菌丝浓密,耳 97-2、耳 913 菌丝较浓。

2.3 黑木耳菌株菌丝形态的显微观察

40 倍显微镜下观察 7 个黑木耳菌株菌丝直径、分隔情况及菌丝锁状联合情况,结果见图 2、表 3。

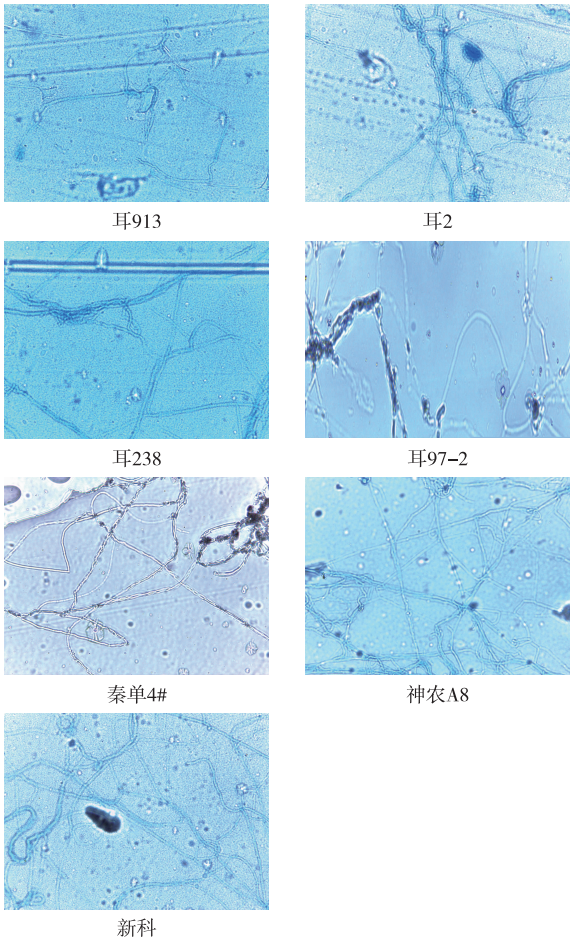


图 2 黑木耳菌株菌丝显微观察

Fig. 2 Mycelia microscopic investigation in different *Auricularia auricular* strains

表 3 黑木耳菌株菌丝显微观察(40 倍光学显微镜)

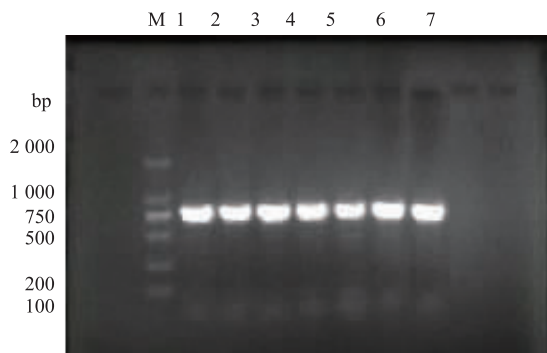
Table 3 Mycelia microscopic investigation in different *Auricularia auricular* strains

黑木耳品种	黑木耳菌丝直径/ μm	有无分隔	有无锁状联合
耳 2	2.5~3.5	无	无
耳 268	1.5~3.5	无	无
耳 97-2	2.5~3.5	无	无
神农 A8	2.5~3.5	无	无
新科	1.5~3.5	无	无
耳 913	1.5~3.5	无	无
秦单 4 [#]	2.5~3.5	无	无

图 2 和表 3 表明,黑木耳菌株耳 268、新科、耳 913 菌丝的直径为 1.5~3.5 μm ,耳 2、耳 97-2、神农 A8、秦单 4[#] 菌丝的直径为 2.5~3.5 μm ;7 个黑木耳菌株均无横隔,无锁状联合。

2.4 黑木耳菌株 ITS-PCR 扩增后电泳图

取 5 μL PCR 产物,用 1 g/dL 琼脂糖凝胶(TBE 缓冲液)电泳检测,于 Tanon 3500R 凝胶成像系统(中国 TANON 公司产品)拍照,电泳结果见图 3。



泳道 1~7 为 PCR 扩增产物,1:新科,2:耳 268,3:秦单 4[#],4:耳 2,5:耳 913,6:神农 A8,7:97-2;M 为 DNA Marker

图 3 PCR 扩增产物电泳图

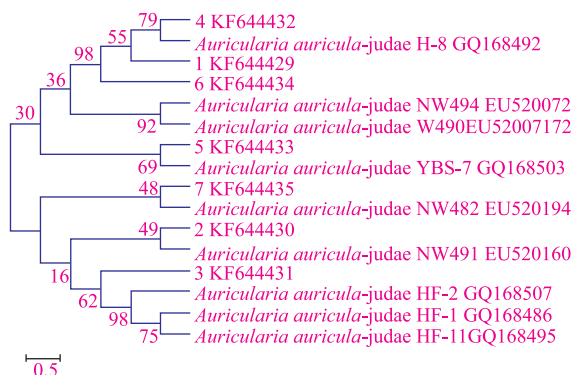
Fig. 3 Electrophoresis of PCR amplification products

图 3 显示,黑木耳 7 个菌株的基因组 DNA 经 PCR 扩增后获得了单一的条带,菌株的 rDNA ITS 的区域的序列片段长度大小为 750 bp 左右。PCR 扩增获得的目的片段含有 ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2 序列,分别将这 7 条序列提交给 NCBI 公共数据库 GeneBank,利用 NCBI 的软件 BLAST 进行网上比对。

2.5 系统进化树的构建

将获得的 7 个 ITS 序列提交 GenBank,黑木耳菌株新科、耳 268、秦单 4[#]、耳 2、耳 913、神农 A8、

97-2 的收录号依次为:KF644429、KF644430、KF644431、KF644432、KF644433、KF644434、KF644435。再进行 Blast 检索对比后,得到同源性较高菌株的 ITS 序列,下载 9 个具有代表性菌株序列与作者所测的 7 个菌株 ITS 序列利用 Clustal X 软件将序列匹配排列后,用 MEGA 5 软件采用邻近相邻法构建系统发育树,树枝上方数值为 bootstrap 值,结果见图 4。



树枝上的数字表示 Bootstrap 验证中该树枝的可信度;其余为 GenBank 中相关菌种的登陆号

图 4 基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on ITS sequences

从邻近相邻法构建的系统发育树上可以看出,新科、耳 2、耳 913、神农 A8 此 4 个菌种亲缘关系比较近;耳 268、秦单 4[#]、耳 97-2 此 3 个菌种亲缘关系比较近。其中耳 2 和标准菌株 *Auricularia auricular-judae* HF-8(GQ168492)聚类在同一分支上;耳 913 和标准菌株 *Auricularia auricular-judae* YBS-7 (GQ168503) 聚类在同一分支上,且神农 A8 与新科、耳 2、耳 913 亲缘关系相对较远。耳 97-2 和标准菌株 *Auricularia auricular-judae* NW482(EU520194) 聚类在同一分支上;耳 268 和标准菌株 *Auricularia auricular-judae* NW491(EU520160)聚类在同一分支上,且秦单 4[#] 与耳 97-2、耳 268 亲缘关系相对较远。

3 结 语

作者对秦巴山区黑木耳 7 个主要栽培种的遗传性进行了分析和探讨,为黑木耳部分种群遗传结构的研究提供了形态、分子水平证据和基础资料。

由于 ITS 区不加入成熟核糖体,所以受到的选择压力较小,进化速率较快,在绝大多数的真核生物中表现出了极为广泛的序列多态性;同时 ITS 序

列长度适中,从人类到酵母的各种真核生物中 ITS 的序列长度约为 300~1 000 bp。因此,可以从不太长的序列中获得足够的信息,已受到真菌分类学者的广泛关注。rDNA-ITS 序列变异较快,可提供比较丰富的变异位点和信息位点,因此可作为一种分子标记用于探讨真菌种内变异和属内种间分子系统关系^[16-17]。近年来,肖薇等利用 rDNA-ITS 序列提出了冬虫夏草复合群体及其包含的 3 个隐存种的假设^[18],曹杰利用 ITS 序列分析证明 8 种鹅膏菌的种间具有较高的遗传多样性^[19]。由于 ITS 序列具有方便、快速的特点,因此也用于鉴定一些未知植株,如侯军利用 ITS 序列对疑似菌株白羊肚菌进行了初步分子鉴定^[20]。

作者通过对 7 个黑木耳菌株的形态特征和序列比较分析表明,耳 2 和标准菌株 *Auricularia auricula-judae* HF-8 (GQ168492) 聚类在同一分支上;耳 913 和标准菌株 *Auricularia auricula-judae*

YBS-7 (GQ168503) 聚类在同一分支上,且神农 A8 与新科、耳 2、耳 913 亲缘关系相对较远。耳 97-2 和标准菌株 *Auricularia auricula-judae* NW482 (EU520194) 聚类在同一分支上;耳 268 和标准菌株 *Auricularia auricula-judae* NW491 (EU520160) 聚类在同一分支上,且秦单 4[#] 与 97-2、耳 268 亲缘关系相对较远。新科、耳 2、耳 913、神农 A8 此四个菌种亲缘关系比较近;耳 268、秦单 4[#]、耳 97-2 此三个菌种亲缘关系比较近。

作者通过对秦巴山区黑木耳主要栽培菌株的形态特征及 ITS 序列的获得与系统进化树的构建,菌株神农 A8 和秦单 4[#] 可作为原生质体制备、融合及再生的优势菌株,为高产优质的黑木耳品种的遗传育种奠定理论基础。由于受时间和条件限制,研究供试的秦巴山区黑木耳主要栽培菌株较少,在今后研究中将进一步扩大取样数量和取样范围。

参考文献:

- [1] 杨新美. 中国食用菌栽培学[M]. 北京:中国农业出版社,1988:12-15.
- [2] 章克昌. 药用真菌研究开发的现状及发展[J]. 食品与生物技术学报,2002(1):24-27.
ZHANG Kechang. The situation and feature of research and development of pharmaceutical fungi [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2002(1):24-27. (in Chinese)
- [3] 陈丽华,章克昌. 8 味中药对黑木耳发酵的影响[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(5):104-105.
CHEN Lihua, ZHANG Kechang. Effects of eight kinds of Chinese traditional medicines on submerged fermentation of *Auricularia auricular* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(5):104-105. (in Chinese)
- [4] Tang L H, Xiao Y, Li L, et al. Analysis of genetic diversity among Chinese *Auricularia auricula* cultivars using combined inter-simple sequence repeat (ISSR) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers [J]. **Current Microbiol**, 2010, 61:132-140.
- [5] 张介驰,马庆芳,张丕奇,等. 用 ISSR 分子标记鉴别东北地区黑木耳生产菌株的研究[J]. 菌物学报,2007,26(4):534-538.
ZHANG Jiechi, MA Qingfang, ZHANG Piqi, et al. Identification of cultivated strains of *Auricularia auricula* from northeastern China by ISSR marker [J]. **Mycosystema**, 2007, 26(4):534-538. (in Chinese)
- [6] 刘华晶,许修宏,郑林用,等. 基于 ITS 序列分析探讨大兴安岭地区野生黑木耳菌株的遗传多样性[J]. 四川农业大学学报,2011,29(1):40-44.
LIU Huajing, XU Xiuhong, ZHENG Linyong, et al. A study on genetic diversity of wild *Auricularia auricula* in greater khingan mountains area based on ITS sequence analysis [J]. **Journal of Sichuan Agricultural University**, 2011, 29 (1):40-44. (in Chinese)
- [7] Tedersoo L, Suvi T, Jairus T, et al. Revisiting ectomycorrhizal fungi of the genus *Alnus*: differential host specificity, diversity and determinants of the fungal community [J]. **New Phytologist**, 2009, 182(3):727-735.
- [8] 李海波,吴学谦,魏海龙,等. 基于形态特征和 ITS 序列对 7 个鹅膏菌属菌株的分类鉴定[J]. 菌物研究,2007,5(1):14-20.
LI Haibo, WU Xueqian, WEI Hailong, et al. A primary studies on classification and identification of seven *Amanita* species based on morphological characteristics and ITS sequences of rDNA [J]. **Journal of Fungal Research**, 2007, 5(1):14-20. (in Chinese)
- [9] Alaei H, Backer M, Nuytinck, et al. Phylogenetic relationships of *Puccinia horiana* and other rust pathogens of *Chrysanthemum × morifolium* based on rDNA ITS sequence analysis [J]. **Mycological Research**, 2009, 113(6-7):668-683.

- [10] Brock P M, Doring H, Bidartondo M I. How to know unknown fungi; the role of a herbarium [J]. **New Phytologist**, 2009, 181: 719–724.
- [11] 黄晨阳, 陈强, 高山, 等. 侧耳属主要种类 ITS 序列分析[J]. 菌物学报, 2010, 29(3): 365–372.
HUANG Chenyang, CHEN Qiang, GAO Shan, et al. Analysis of internal transcribed spacer regions of main species of the genus *Pleurotus* [J]. **Mycosystema**, 2010, 29(3): 365–372. (in Chinese)
- [12] 马荣群, 黄粤, 宋正旭, 等. 辣椒炭疽病 3 病原核糖体基因 ITS 区的序列测定及分析[J]. 西南农业学报, 2007, 20(6): 1234–1236.
MA Rongqun, HUANG Yue, SONG Zhengxu, et al. Analysis on sequence of ribosomal DNA–ITS of the pathogen for pepper anthracnose [J]. **Southwest China Journal of Agricultural Sciences**, 2007, 20(6): 1234–1236. (in Chinese)
- [13] 林范学, 林芳灿. 香菇亲本菌株及其杂交后代的 RAPD 分析[J]. 菌物系统, 1999, 18(3): 279–283.
LIN Fanxue, LIN Fangcan. RAPD analysis of parental strains and their crossing progenies of *Lentinula edodes* [J]. **Mycosystema**, 1999, 18(3): 279–283. (in Chinese)
- [14] Xu J, Yoell H J, Anderson J B. An efficient protocol for isolating DNA from higher fungi [J]. **Trends in Genetics**, 1994, 10: 226–227.
- [15] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. **California: Academic Press**, 1990.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. **Molecular Biology and Evolution**, 2007, 24: 1596–1599.
- [17] Glen M, Tommerup I C, Bougher N L, et al. Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR–RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in eucalyptus forests and plantations [J]. **Mycological Research**, 2001(105): 138–149.
- [18] XIAO Wei, YANG Jinling, ZHU Ping, et al. Non-support of species complex hypothesis of *Cordyceps sinensis* by targeted rDNA–ITS sequence analysis [J]. **Mycosystema**, 2009, 28(5): 724–730.
- [19] 曹杰, 张志国, 刘弟, 等. 滇藏地区 8 种鹅膏菌的 ITS 序列分析[J]. 云南大学学报, 2009, 31(1): 90–96.
CAO Jie, ZHANG Zhiguo, LIU Di, et al. ITS sequence analysis of 8 amanita species from Tibetan and Yunnan [J]. **Journal of Yunnan University**, 2009, 31(1): 90–96. (in Chinese)
- [20] 侯军, 林晓民, 江芸, 等. 基于 ITS 序列分析对疑似白羊肚菌株的分子鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(5): 141–145.
HOU Jun, LIN Xiaomin, JIANG Yun, et al. Molecular identification of suspected “Baiyangdu” strain based on internal transcribed spacer sequence analysis [J]. **Food Science**, 2009, 30(5): 141–145.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第 10 届国际生物信息学研究和应用研讨会

会议名称(英文): 10th International Symposium on Bioinformatics Research and Applications (ISBRA2014)

所属学科: 生物信息学, 计算机应用技术

开始日期: 2014–06–28

结束日期: 2014–06–30

所在城市: 湖南省 张家界市

主办单位: 中南大学、Georgia State University

摘要截稿日期: 2014–02–01

联系人: 王建新

联系电话: 086–731–88830212

E-MAIL: jxwang@mail.csu.edu.cn

会议网站: <http://isbra2014.csu.edu.cn/isbra14/>