

# 中国主栽银耳配对香灰菌的系统发育和遗传多样性

温文婷<sup>1</sup>, 贾定洪<sup>2</sup>, 郭勇<sup>2</sup>, 孙群<sup>1</sup>, 杨志荣<sup>1</sup>, 彭卫红<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>四川大学生命科学学院, 成都 610064; <sup>2</sup>四川省农业科学院土壤肥料研究所, 成都 610066)

**摘要:** 【目的】了解中国主栽银耳配对香灰菌的分类地位及遗传多样性, 为香灰菌资源利用和育种提供分子生物学依据。【方法】采用 18S-28S rDNA 间隔区(ITS4/ITS5)的 PCR 扩增和内部简单重复序列多态性(ISSR)分子标记, 对中国主栽银耳配对香灰菌的遗传多样性进行分析。【结果】16 株供试菌株 ITS 序列分析表明, 供试菌株与 *Annulohyphoxylon stygium* 关系最为接近, 同源性高达 99%。从 70 个 ISSR 引物中筛选出了 11 个多态性好的引物, 共获得 62 条 ISSR 标记。以相关系数 0.7 为阈值, 将 16 株菌划为 5 个遗传组, 菌株间遗传差异较大, 遗传多样性较高。【结论】中国主栽银耳地区的香灰菌遗传资源较为丰富, 这为利用香灰菌资源选育新品种提供了可能。

**关键词:** 银耳; 伴生菌; 遗传多样性; 聚类分析

## Phylogeny and Genetic Diversity of *Annulohyphoxylon* spp. Paired with Cultivated *Tremella fuciformis* Berk.

WEN Wen-ting<sup>1</sup>, JIA Ding-hong<sup>2</sup>, GUO Yong<sup>2</sup>, SUN Qun<sup>1</sup>, YANG Zhi-rong<sup>1</sup>, PENG Wei-hong<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064; <sup>2</sup>Soil and Fertilizer Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066)

**Abstract:** 【Objective】The aim of this paper is to study the classification and genetic diversity of Xianghui and to provide biological information on utilization and breeding of Xianghui. 【Method】The phylogeny of 16 strains of Xianghui, which were collected from different provinces and paired with cultivated *Tremella*, was determined by ITS sequences analysis. Furthermore, the genetic diversity of these strains was analyzed by inter-simple sequence repeat (ISSR). 【Result】The ITS sequences of the 16 strains were analyzed and the phylogenetic tree was constructed, and the results revealed that the homology between Xianghui and *Annulohyphoxylon stygium* was 99%. Among the 70 ISSR primers, 11 with high polymorphism were selected and a total of 62 ISSR markers were obtained. At 0.7 similarity distance, cluster analysis revealed the existence of five distinct genetic groups. 【Conclusion】The 16 strains of *Annulohyphoxylon* spp. investigated showed low genetic similarity and genetic variations at DNA level significantly.

**Key words:** *Tremella fuciformis*; accompanying fungi; genetic diversity; cluster analysis

## 0 引言

【研究意义】银耳 (*Tremella fuciformis* Berk.) 为中国著名传统食药兼用真菌, 中医认为, 银耳具有补肾、润肺、生津、止咳之功效, 现代医学证实银耳能提高人体免疫能力<sup>[1-2]</sup>。与大多数生产栽培的食用菌种

类不同, 银耳生活史的完成必须有伴生菌香灰菌的协同作用<sup>[3]</sup>, 香灰菌的活力与银耳产量直接相关, 但生产中银耳与香灰菌的严格配对关系及香灰菌分类地位的不确定, 为银耳新品种选育带来了巨大障碍<sup>[4]</sup>, 探析香灰菌的遗传差异, 明确香灰菌的分类地位, 对保障银耳产业的健康发展具有重要意义。【前人研究进

收稿日期: 2009-05-12; 接受日期: 2009-07-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30972074)、四川省财政教育工程资助项目 (2006YZCC09-024)、四川省农业科学院优秀基金项目 (2009YXLWJJ-007)

作者简介: 温文婷, 硕士研究生。E-mail: enjoymew2t@yahoo.com.cn。通信作者彭卫红, 研究员。Tel: 028-84504712; Fax: 028-84787971; E-mail: pwh424@163.com

展】杨新美提出，香灰菌是绿粘帚霉，其有性世代为碳团菌属的一种 (*Hypoxylon* sp.)，随后，认为其为碳团菌属 *Hypoxylon* 的无性阶段，学名初步鉴定为 *Gliocladium virens*<sup>[5]</sup>；臧穆将其发现的与银耳共同生长的香灰菌新种定名为香灰拟锁担菌 (*Filobasidiella xianghuijun* Zang)<sup>[6]</sup>，但也有人认为香灰菌可能不是单一的物种，可能隶属于碳团属和碳豆属，有 3—4 种，其中一种经鉴定初步认为是阿尔碳团 (*Hypoxylon archeri*)<sup>[7]</sup>。谢宝贵等通过对 1 株香灰菌 ITS 序列分析，认为在 DNA 水平上，该香灰菌与 *Hypoxylon stygium* 很相似<sup>[8]</sup>。目前有关香灰菌的研究较少，仅限于不同菌株生长特性差异研究<sup>[9-10]</sup>、培养性状的观察、对银耳生长的影响<sup>[11]</sup>及香灰菌黑色素方面<sup>[12-13]</sup>等，在香灰菌分类地位、遗传多样性及种质资源方面存在较

多的争议和研究空白。【本研究切入点】香灰菌的分类地位是其中悬而未决的问题之一。由于香灰菌菌丝体结构相对简单，一直未能确定其有性阶段，传统分类研究受到了较多的局限，利用分子标记技术进行香灰菌的分类研究重要性凸显。【拟解决的关键问题】利用 ITS 序列分析和 ISSR 技术，分析香灰菌的系统发育，并进行遗传多样性分析，以期为香灰菌与银耳的相互作用机理、银耳及香灰菌品种选育等提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

收集了中国不同地区主栽银耳的配对香灰菌 16 株，供试菌株的编号、来源等见表 1。

表 1 供试香灰菌株

Table 1 Strains of Xianghui tested in this study

菌株编号 Strain code	菌株 Strain	来源 Origin
1	wsw07-1	四川省农业科学院土壤肥料研究所 Soil and Fertilizer Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences
2	xhnj03	四川省南江县 Nanjiang County, Sichuan Province
3	xhtj524	四川省农业科学院土壤肥料研究所 Soil and Fertilizer Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences
4	101 香灰 101 Xianghui	四川省通江县涪阳 Fuyang, Tongjiang County, Sichuan Province
5	1-2 香灰 1-2 Xianghui	通江银耳科学研究所 Institute of Tremella, Tongjiang Academy
6	3#香灰 3# Xianghui	通江银耳科学研究所 Institute of Tremella, Tongjiang Academy
7	Hp-Sp001	福建农林大学 Fujian Agriculture and Forestry University
8	银环香灰 Yinhuan Xianghui	通江银耳科学研究所 Institute of Tremella, Tongjiang Academy
9	05/08 Xianghui	武汉新宇食用菌研究所 Institute of Edible Fungi of Wuhan Xinyu
10	88 Xianghui	福建 Fujian Province
11	9901	福建三明真菌研究所 Institute of Fungi of Fujian Sanming
12	Henan Xianghui	河南泌阳真菌研究所 Institute of Edible Fungi of Henan Biyang
13	2007 通江 2007 Tongjiang	四川通江栽培银耳配对香灰 Tongjiang, Sichuan, cultivated strains
14	23 香灰 23 Xianghui	福建省古田县 Gutian County, Fujian Province
15	玉林 03 Yulin 03	华中农业大学 Huazhong Agricultural University
16	T29	福建古田 Gutian County, Fujian Province

### 1.2 试剂

本试验所用 Taq DNA 聚合酶、dNTPs 购自立陶宛的 MBI Fermentas 公司，ISSR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。其它试剂购自成都市长征化学试剂公司。

### 1.3 香灰菌的培养与菌丝体收集

香灰菌斜面菌种接入含 25 mL 马铃薯蔗糖液体培养基（土豆 20%，蔗糖 2%，水 1 000 mL）的三角瓶

中，25℃培养 10 d。将培养好的菌丝体用无菌滤纸吸干水分，-20℃保存备用。

### 1.4 DNA 提取

菌丝体 DNA 的提取参照 CTAB 法<sup>[14]</sup>进行，略作改进。取 50 mg 菌丝，加入液氮研磨成粉末状，加入 600 μL CTAB 抽提液（2% CTAB，100 mmol Tris-HCl (pH 8.0)，20 mmol EDTA，1.4 mol NaCl，pH 8.0，2% β-巯基乙醇）中，65℃温浴 1 h。在抽提液中加入

650  $\mu\text{L}$  氯仿-异戊醇 (24 : 1), 混匀后离心取上清, 同法再抽提 1 遍。在上清中加入 1 mL CTAB 沉淀液 [1% CTAB, 50 mmol Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol EDTA], 室温沉淀 30 min, 12 000 r/min 离心 4 min, 倒上清, 将沉淀溶于 400  $\mu\text{L}$  高盐 TE [10 mmol Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mmol EDTA, 1 mol NaCl], 37°C 30 min 溶解。加入两倍体积 -20°C 无水乙醇在 -20°C 沉淀 2 h, 12 000 r/min 离心 5 min, 风干后加入 80  $\mu\text{L}$  TE。取 4  $\mu\text{L}$  DNA 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 剩余 DNA -20°C 保存备用。

### 1.5 ITS 分析

以 ITS 通用引物 ITS4/ITS5 对 16 株香灰菌进行 PCR 分析。ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'。扩增反应体系为 30  $\mu\text{L}$  反应液, dNTPs 0.3 mmol·L<sup>-1</sup>, Ex Taq DNA 聚合酶 1 U, 模板 DNA 40 ng, 3  $\mu\text{L}$  10× Buffer [200 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl; 100 mmol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 200 mmol·L<sup>-1</sup> KCl; 15 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>], ITS4/ITS5 引物 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。反应程序为: 94°C 5 min, 然后 94°C 30 s, 54°C 45 s, 72°C 1 min, 35 个循环, 最后 72°C 下延伸 6 min。扩增产物 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 委托 Invitrogen 公司对 ITS PCR 产物直接测序, 应用 MEGA4.0 软件进行序列分析。

### 1.6 ISSR-PCR

扩增反应体系为 20  $\mu\text{L}$  反应液, dNTPs 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>, Primer 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Ex Taq DNA 聚合酶 1 U, 模板 DNA 40 ng, 2  $\mu\text{L}$  10 × Buffer [200 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl; 100 mmol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 200 mmol·L<sup>-1</sup> KCl; 15 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>]。从 70 个 ISSR 引物中, 共筛选出多态性好、扩增条带清晰的引物 11 个 (表 2)。反应程序为: 94°C 预变性 5 min, 然后 94°C 30 s, 相应退火温度 45 s, 72°C 1.5 min, 35 个循环, 最后 72°C 下延伸 6 min。扩增产物 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳。

### 1.7 数据分析

系统发育树状图用 MEGA 4.0 分析软件, 用 NJ 法构建; 对电泳谱带进行记录, 在相同位置出现条带的记为 1, 无条带的记为 0, 构建初始数据矩阵, 用 NTSYSpc 2.1 专业版软件用平均连锁法 UPGMA 进行聚类分析, 得出聚类图谱。

## 2 结果

### 2.1 ITS 序列同源性分析及系统发育树的建立

表 2 筛选出的 11 个 ISSR 引物及其退火温度

Table 2 The 11 selected ISSR primers and their annealing temperature

引物编号 Primer No.	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度(°C) Annealing temperature
UBC817	(CA) <sub>8</sub> A	52
UBC818	(CA) <sub>8</sub> G	54
UBC827	(AC) <sub>8</sub> G	54
UBC830	(TG) <sub>8</sub> G	54
UBC831	(ACC) <sub>6</sub>	62
UBC832	(AGC) <sub>6</sub>	62
UBC835	(CCG) <sub>6</sub>	75
UBC837	(GGC) <sub>6</sub>	75
UBC851	GGGT(GGGGT) <sub>2</sub> G	62
UBC864	(CAC) <sub>4</sub> GC	46
UBC865	(AG) <sub>8</sub> CC	52

供试菌株的 ITS 测序结果显示, 序列长度为 880—891 bp 不等, 所得 16 个菌株的序列都已提交 GenBank, 获得注册号分别为 FJ848850—FJ848865。应用 MEGA4.0 软件对 ITS 序列进行比对分析。结果表明, 16 株菌序列差异很小, 中间 876 bp 相同, 仅序列首尾有较小变化, 说明从 ITS 水平 16 株菌可视为一个种。从 16 株菌中选出 XH1 作为代表, 与 GenBank 数据库中获取相应菌株的 ITS 序列进行比较, 以确定香灰菌的系统发育地位。用 MEGA4.0 构建系统发育树 (图 1)。从图 1 可看出, 香灰菌与 *Annulohyphoxylon stygium* (EU272517) 遗传距离最近, 相似性达 99%。

### 2.2 ISSR 聚类分析

从 70 个引物中筛选出 11 条引物, 可扩增出清晰且多态性好的 62 条 ISSR 标记, 扩增后标记出的 DNA 片段的分子量大小变化范围为 250—2 000 bp, 其中 27 号引物对 16 株香灰菌的扩增结果如图 2 所示。ISSR 聚类分析结果显示, 16 株香灰菌的相似系数在 0.62—0.89 范围内, 未发现遗传背景完全相同的菌株。在遗传相似系数 0.7 处, 可将 16 株香灰菌分为 5 个 ISSR 遗传组 (图 3)。其中 A 组由 7 个菌株构成, 包括四川主栽银耳的配对香灰菌株 wsw07-1 香灰、xhnj03、xhtj524、101 香灰、2007 通江等, 从图 3 可以得出它们的遗传相似系数为 0.74; B、C、E 组均由 2 个菌株构成, B 组中的 Hp-Sp001、T29 均来自福建, 它们的相似系数为 0.74; C 组的 88、9901 均来自福建, 相似系数为 0.71; E 组的 23 香灰和玉林 03 相似程度最大, 相似系数达 0.89; D 组由 3 个

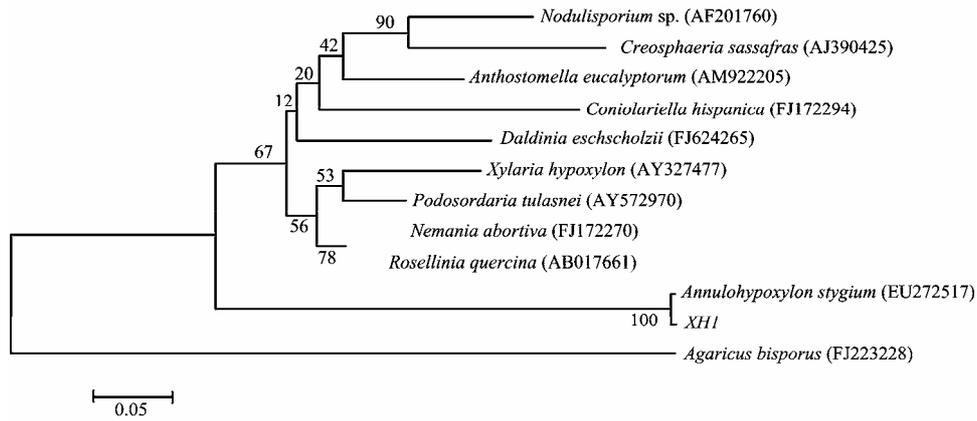
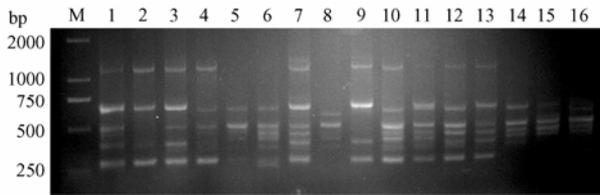


图 1 以 ITS 序列为基础的系统发育树状图

Fig. 1 The phylogenetic tree based on ITS sequences



M: DL2000; 1—16 号泳道: 1—16 号菌株  
M: DL2000; lanes 1-16: strains No.1 to No.16

图 2 引物 27 号扩增供试香灰菌的 ISSR 指纹图谱

Fig. 2 ISSR fingerprinting profiles of *Annulohyphoxylon* spp. strains amplified with primer 27

菌株构成, 包括 1-2 香灰、3#香灰及银环, 它们均来自四川通江银耳科学研究所。

### 3 讨论

1954 年以来, 有关香灰菌的分类地位一直未有定论, 分子生物学技术的发展为真菌的分类鉴定开辟了新的途径。rDNA 的内转录间隔区 ITS<sub>1</sub> 和 ITS<sub>2</sub> 作为非编码区, 承受的选择压力较小, 相对变化较大, 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, 基本上表现为种内相对一致, 种间差异比较明显。这种特点使 ITS 适合于真菌物种的分子鉴定以及属

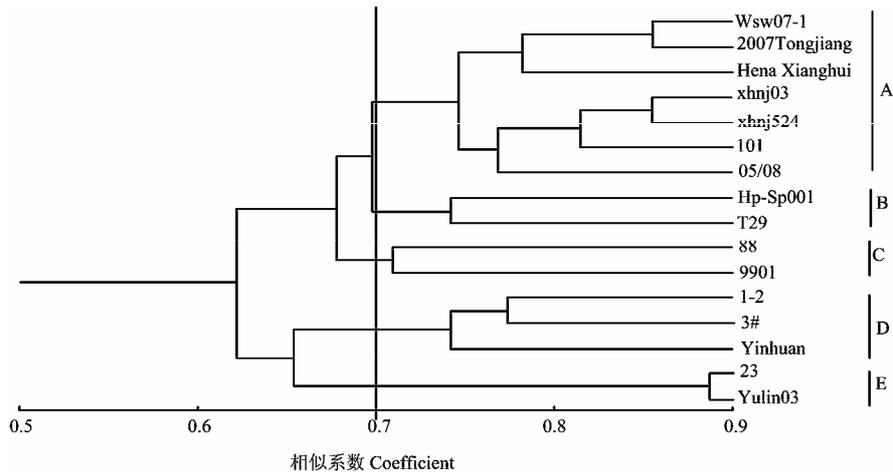


图 3 16 株香灰菌株的 ISSR 遗传分析聚类图

Fig. 3 Dendrogram of cluster among 16 *Annulohyphoxylon* spp. strains based on ISSR analysis

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,已被广泛应用于真菌的系统发育研究<sup>[15-16]</sup>。

本研究结果表明,16株香灰菌通过MEGA4.0软件进行序列的对齐(alignment),构建系统发育树,显示16株菌ITS具有很高的同源性,其中876bp相同,仅首尾几个碱基有差异,可以认为属于种内不同菌株间的正常差异范围,在ITS水平上,基本可判定所有供试菌株为同一个种。这表明中国当前银耳生产中所采用的香灰菌大多属于同一个生物种。这与黄年来曾提出,香灰菌可能不是单一的物种,有3—4种的观点是不一致的。由于本研究采用的供试菌株为生产中主栽银耳的配对香灰菌菌株,所以野生香灰菌菌株是否与当前主栽菌株存在“种”的差异,香灰菌是否存在1个以上的种,需要扩大供试菌株的范围,才能确定。

通过ITS序列聚类分析,供试的16个菌株与GenBank序列比对的结果表明,供试香灰菌菌株与*Annulohyphoxylon stygium*遗传距离最近,相似度高达99%,基本可以判定为同一种。根据Hsieh等研究结果,认为*Annulohyphoxylon stygium*即为*Hypoxylon stygium*<sup>[17]</sup>。本项研究结果支持谢宝贵认为香灰菌与*Hypoxylon stygium*很相似的观点<sup>[8]</sup>。

中国银耳生产长期沿用“同穴的银耳和香灰才能配对”的制种模式<sup>[7]</sup>。这种模式对银耳育种工作造成了一定的困扰,一方面构建的银耳杂交菌株,因缺乏适宜的香灰菌与之配对而不能用于生产,另一方面优良香灰菌也常因找不到配对的银耳而失去应用价值。研究中,因银耳与香灰菌的配对机理不清,育种工作中配对常是盲目的,效率低,工作量大。中国银耳产区目前均出现不同程度的银耳、香灰菌老化、退化现象,对银耳产量造成明显影响,就与此研究的不足有一定的直接联系。

笔者推测,一些香灰菌不能与银耳配对出耳,可能是不同来源的香灰菌本身存在一定的特异性,这种特异性包括酶系的特异性、代谢产物的特异性和遗传的特异性等诸多方面。而遗传的特异性是需要关注的重要内容之一,从分子水平分析不同来源的香灰菌遗传差异,对促进配对机理研究具有积极的意义。

ISSR标记技术是利用真核生物基因组内广泛存在的简单重复序列,设计单一的简单重复序列作为引物对基因组DNA进行扩增的方法,是一种简便易行且能更好揭示多态性的分子标记<sup>[18]</sup>。近几年该技术已受到生物学家的高度重视,并在黑木耳<sup>[19]</sup>、小菊<sup>[20]</sup>、

青麻<sup>[21]</sup>、烟草<sup>[22]</sup>、大麦<sup>[23]</sup>、黄麻<sup>[24]</sup>、油菜<sup>[25]</sup>等多种生物遗传多样性分析中成功应用。

本研究利用ISSR首次对中国香灰菌资源进行遗传多样性分析。结果表明,中国主栽银耳配对的香灰菌显示了较高的遗传多样性,未发现遗传相似性100%的菌株,最高相似性89%。同时,供试菌株显示了在地理分布上的特异性,在遗传相似系数0.7处,可将供试菌株分为5个ISSR遗传组,从福建银耳产区收集的以袋料银耳栽培为主的菌株,全部集中在B、C、E组。四川通江银耳产区,以椴木栽培为主的菌株主要分布在A和D组。表明同一区域内的菌株遗传相似程度高于不同区域来源的香灰菌。笔者在研究中发现,供试的香灰菌与银耳交叉配对,均不能形成子实体。推测遗传差异导致基因表达的差异,这种差异导致酶系的差异和代谢产物的差异,最终限制了配对银耳的选择。在进一步的工作中,对银耳菌株的遗传差异进行分析,将有助于配对机理的研究。

## 4 结论

本研究采用分子生物学方法,确定中国主栽银耳的配对香灰菌均为同一个种即*Annulohyphoxylon stygium*。研究结果显示,供试菌株存在丰富的遗传多样性,菌株间遗传分化明显。同时供试菌株也具有地理分布的特异性,不同产区的香灰菌分别聚为不同的ISSR遗传组。推测香灰菌的遗传差异与银耳配对能力具有一定的相关性。

## References

- [1] 陈飞飞,蔡东联. 银耳多糖的主要生物学效用研究进展. 中西医结合学报, 2008, 6(8): 862-866.  
Chen F F, Cai D L. Research advances in primary biological effects of *Tremella polysaccharides*. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2008, 6(8): 862-866. (in Chinese)
- [2] 徐文清,高文远,沈秀,王月英,刘培勋. 银耳孢子多糖抑制肿瘤及放射增效作用的研究. 中国生化药物杂志, 2006, 27(6): 351-354.  
Xu W Q, Gao W Y, Shen X, Wang Y Y, Liu P X. Studies on anti-tumor and synergism combined with  $\gamma$ -rays of polysaccharide from *Tremella fuciformis* ferment in mice. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2006, 27(6): 351-354. (in Chinese)
- [3] 黄年来. 银耳菌种生产的原理和方法. 食用菌, 2007(1): 25-27.  
Huang N L. The principle and technique of *Tremella fuciformis* production. *Edible Fungi*, 2007(1): 25-27. (in Chinese)

- [4] 彭卫红, 王 勇, 黄忠乾, 甘炳成. 我国银耳研究现状与存在问题. 食用菌学报, 2005, 12(1): 51-56.  
Peng W H, Wang Y, Huang Z Q, Gan B C. The present situation of *Tremella fuciformis* research and problems existed in China. *Acta Edulis Fungi*, 2005, 12(1): 51-56. (in Chinese)
- [5] 杨新美. 中国食用菌栽培学. 北京: 农业出版社, 1988: 379-380.  
Yang X M. *The Cultivation of Edible Fungi in China*. Beijing: Agriculture Press, 1988: 379-380. (in Chinese)
- [6] 臧 穆. 与银耳生长的香灰菌新种. 中国食用菌, 1999, 18(2): 43-44.  
Zang M. A new taxon, *Filobasidiella xianghuijun* Zang, associated with *Tremella fuciformis*. *Edible Fungi of China*, 1999, 18(2): 43-44. (in Chinese)
- [7] 黄年来. 中国银耳生产. 北京: 中国农业出版社, 2000: 1-187.  
Huang N L. *The Production of Tremella fuciformis in China*. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 1-187. (in Chinese)
- [8] 谢宝贵, 应正河, 黄年来, 邓优锦, 陈 彬. 银耳伴生菌分类地位研究. 菌物学报, 2005, 24 (增): 73-77.  
Xie B G, Ying Z H, Huang N L, Deng Y J, Chen B. Studies on systematic diversity of *Tremella fuciformis* cohabitant fungus. *Mycosystema*, 2005, 24(Suppl. ): 73-77. (in Chinese)
- [9] 彭卫红. 不同香灰菌株生长特性差异研究. 西南农业学报, 2003, 16 (增): 162-164.  
Peng W H. Studies on the growing characteristics of different Xianghui strains. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2003, 16 (Suppl. ): 162-164. (in Chinese)
- [10] 彭卫红. 对香灰菌液体培养生产银耳子实体现象的分析初报. 西南农业学报, 2005, 18 (增): 175-176.  
Peng W H. Brief introduction of forming *Tremella fuciformis* fruitbody in Xianghui strains liquid culture. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2005, 18 (Suppl. ): 175-176. (in Chinese)
- [11] 陈 明, 汪国莲, 陈立国. 香灰菌浸出液对银耳菌丝体生长的影响. 食用菌, 2000(4): 10-11.  
Chen M, Wang G L, Chen L G. Effect on *Tremella fuciformis* mycelial growing of extraction of Xianghui strains. *Edible Fungi*, 2000(4): 10-11. (in Chinese)
- [12] 吴 尧, 马爱民, 侣国涵, 王雪梅, 谢笔钧. 香灰菌黑色素的分离及抗氧化活性研究. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 470-473.  
Wu Y, Ma A M, Lü G H, Wang X M, Xie B J. Isolation and antioxidant activity of melanin pigment from *Hypoxylon* sp. *Natural Product Research and Development*, 2007, 19: 470-473. (in Chinese)
- [13] 吴 尧, 王雪梅, 马爱民, 谢笔钧. 香灰菌黑色素对真菌生长及多酚氧化酶活性的影响. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 501-504.  
Wu Y, Wang X M, Ma A M, Xie B J. Effects of melanin extracted from *Hypoxylon* sp. on fungal growth and polyphenol oxidase activity. *Natural Product Research and Development*, 2008, 20: 501-504. (in Chinese)
- [14] Cao H, Paul P H, Shaw P C. Methodological studies on genomic DNA extraction and purification from plant drug materials. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 1998, 7 (3): 130-137.
- [15] Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 1993, 2(2): 113-118.
- [16] Hibbert D S, Fukumasa N Y, Tsuneda A, Donoghue M J. Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 1995, 87(5): 618-638.
- [17] Hsieh H M, Ju Y M, Rogers J D. Molecular phylogeny of *Hypoxylon* and closely related genera. *Mycologia*, 2005, 97(4): 844-865.
- [18] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [19] 张介驰, 马庆芳, 张丕奇, 戴肖东, 韩增华, 孔祥辉. 用 ISSR 分子标记鉴别东北地区黑木耳生产菌株的研究. 菌物学报, 2007, 26 (4): 534-538.  
Zhang J C, Ma Q F, Zhang P Q, Dai X D, Han Z H, Kong X H. Identification of cultivated strains of *Auricularia auricula* from northeastern China by ISSR marker. *Mycosystema*, 2007, 26(4): 534-538. (in Chinese)
- [20] 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波, 房伟民, 石丽敏. 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3735-3740.  
Miao H B, Chen F D, Zhao H B, Fang W M, Shi L M. Genetic diversity and construction of fingerprinting of chrysanthemum cultivars by ISSR markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(11): 3735-3740. (in Chinese)
- [21] 白占兵, 栗建光, 陈基权, 戴志刚, 王凤敏, 龚友才. 利用 ISSR 标记分析青麻种质资源遗传多样性. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3532-3541.  
Bai Z B, Su J G, Chen J Q, Dai Z G, Wang F M, Gong Y C. Genetic diversity of velvetleaf germplasm revealed by ISSR marker. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(11): 3532-3541. (in Chinese)
- [22] 梁景霞, 祁建民, 方平平, 王 涛, 陈顺辉, 周东新, 陶爱芬, 梁康迳, 吴为人. 烟草种质资源遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 聚类分析. 中国农业科学, 2008, 41(1): 286-294.  
Liang J X, Qi J M, Fang P P, Wang T, Chen S H, Zhou D X, Tao A F, Liang K J, Wu W R. Genetic diversity and genetic relatives analysis of

- tobacco germplasm based on inter-simple sequence repeat(ISSR). *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(1): 286-294. (in Chinese)
- [23] 侯永翠, 颜泽洪, 兰秀锦, 魏育明, 郑有良. 利用 RAMP 和 ISSR 标记分析大麦种质资源的遗传多样性. *中国农业科学*, 2005, 38(12): 2555-2565.
- Hou Y C, Yan Z H, Lan X J, Wei Y M, Zheng Y L. Genetic diversity among barley germplasm with known origins based on the RAMP and ISSR markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(12): 2555-2565. (in Chinese)
- [24] 祁建民, 周东新, 吴为人, 林荔辉, 方平平, 吴建梅. RAPD 和 ISSR 标记检测黄麻属遗传多样性的比较研究. *中国农业科学*, 2004, 37(12): 2006-2011.
- Qi J M, Zhou D X, Wu W R, Lin L H, Fang P P, Wu J M. A comparison between RAPD and ISSR technology in detection of genetic diversity of jute. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(12): 2006-2011. (in Chinese)
- [25] 马朝芝, 傅廷栋, Stine Tuevesson, Bo Gertsson. 用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性. *中国农业科学*, 2003, 36(11): 1403-1408.
- Ma C Z, Fu T D, Tuevesson S, Gertsson B. Genetic diversity of Chinese and Swedish rapeseed (*Brassica napus* L. ) analysed by inter-simple sequence repeats(ISSRs). *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(11): 1403-1408. (in Chinese)

(责任编辑 曲来娥)