

# 黑木耳 18S rDNA 序列变异及遗传多样性分析

桂明英<sup>1</sup>, 赵春艳<sup>1</sup>, 吴素蕊<sup>1</sup>, 熊勇<sup>2</sup>, 郭相<sup>1</sup>

(1. 中华全国供销合作总社 昆明食用菌研究所, 云南 昆明 650221; 2. 云南民族大学, 民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 云南 昆明 650500)

**摘要:**以黑木耳为试材, 利用 PCR 技术扩增黑木耳 18S rDNA 序列并测序, 再用生物软件 Clustalx 2、MEGA 5.1 对测序结果进行分析和 RNA 二级结构预测。根据 18S rDNA 序列多样性分析和预测的二级结构, 研究来自中国东北的 5 个黑木耳栽培菌株的遗传多样性, 以便为黑木耳栽培引种和新品种选育提供参考。结果表明: 扩增的 18S rDNA 序列长度约为 1 700 bp, 去除两端测序质量不好的区域后长度为 1 695 bp, GC 含量为 48.02%~48.32%, 其核苷酸变异位点 25 个, 信息位点 10 个, 变异位点主要集中在 88~107 bp 区域, N-J 系统进化树中 5 个黑木耳聚为一支, 毛木耳单独聚另一支, 18S rDNA 序列分支与传统的分类结果基本一致; 18S rDNA 区序列一、二级结构相结合可为黑木耳分类鉴定提供相关的分子结构信息。

**关键词:**黑木耳; 18SrDNA; 遗传多样性; 二级结构

**中图分类号:**S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0111-05

黑木耳 [*Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quél.] 隶属于担子菌纲木耳目木耳科木耳属, 是珍贵的药食兼用胶质类大型真菌资源, 具有很高的生理活性及药用价值, 也是世界第四大栽培食用菌<sup>[1-2]</sup>, 因经过长期人工驯化定向栽培和自然选择, 其遗传背景复杂, 加之菌种接代过程中杂菌污染, 部分品种的品质退化, 对商业化栽培产生直接影响。因此掌握菌种遗传背景和菌种鉴定是进一步开发利用黑木耳资源的关键<sup>[3]</sup>。18S rDNA 序列是核糖体 RNA 基因 (rDNA) 的部分核糖体基因编码区, rDNA 一个重复单元由非转录间隔区 (NTS)、内部转录间隔区 (ITS) 和 3 种核糖体基因编码区 (18S、5.8S、28S) 组成<sup>[4]</sup>。由于 18S rDNA 序列及二级结构预测研究高度保守, 适合对真菌的系统发育分析, 当前 18S rDNA 序列被应用于许多大型真菌的系统发育关系中, 如灵芝 (*Ganoderma lucidum*)<sup>[5]</sup>、鬼笔目的代表种短裙竹荪 [*Dictyophora duplicata*]、白鬼笔 (*Phallus impudicus*)<sup>[6]</sup>、松茸 (*Tricholoma matsutake*)<sup>[7]</sup>、杨柳田头菇 (*Agrocybe salicicola*)<sup>[8]</sup>、桑黄 (*Phellinus baumii*)<sup>[9]</sup>、香菇 (*Lentinus edodes*)、草菇 (*Volvariella volvacea*)、平菇 (*Pleurotus ostreatus*)<sup>[10]</sup> 等。该试验选用 5 个黑木耳菌

株, 设计相应引物后, 进行 DNA 提取及 PCR 法扩增、测序, 选择香菇作为外群, 基于 18S rDNA 序列, 利用 N-J 法构建系统发育树, 同时用最邻近能量参数的自由能最小原理对其 RNA 的二级结构进行预测, 以期明确不同菌种间进化关系, 为选育高质量优良黑木耳菌种及商业化栽培提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试木耳菌种来源于中华全国供销合作总社昆明食用菌研究所菌种保藏中心, 具体菌种信息情况见表 1。

供试仪器: PCR 仪 (Eppendorf, 德国), 引物、DNA Marker (北京鼎国), 2×Power Taq PCI MasterMix (北京百泰克), 凝胶成像系统 (Bio-Rad, GENE GENIUS, 美国), 电泳仪 (DY-GB, 北京六一), 电泳槽 (DYCP-31DN, 北京六一), 核酸蛋白测定仪 (Eppendorf Biophotometer, 德国)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 引物设计及总 DNA 提取** 根据 Matsumoto 等<sup>[11]</sup> 设计的引物由北京鼎国生物技术有限公司合成, 上游引物 TCCGTAGGTGAACCTGCGG、下游引物 TCCTCCGCTTATTGATATGC; 木耳菌株菌液总 DNA 提取方法参照 SDS 法<sup>[12]</sup> 并加以改良, 采用琼脂糖凝胶电泳检测样品 DNA 质量。

**1.2.2 18S rDNA-PCR 扩增条件** PCR 扩增反应体系总体积 50  $\mu$ L: 25  $\mu$ L 2×Mixture, 引物各 2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L DNA 模板, 16  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O; 反应设置 32 次循环, 包括预

**第一作者简介:**桂明英 (1965-), 女, 博士, 研究员, 现主要从事食用菌资源保护与高效利用等工作。

**基金项目:**科技部科技支撑计划课题资助项目 (2013BAD16B01); 云南省科技厅对外科技合作计划省院省校科技合作专项资助项目 (2012IB008)。

**收稿日期:**2014-04-29

变性 94℃, 5 min、94℃, 1 min、50℃, 1 min、72℃, 2 min、再经过 72℃, 10 min 保证充分延伸, 最后 4℃ 保存。18S rDNA-PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 Bio-Rad 凝胶成像系统观察结果。

1.2.3 PCR 产物的纯化、测序及系统发育树的构建  
每个菌株 DNA 进行 3 个重复扩增后, 采用多功能 DNA 纯化回收试剂盒进行回收, 由北京梓熙生物科技有限公司测序。测序结果用 DNAMAN<sup>[13]</sup> 进行拼接, 拼接好的序列用 MEGA 5.1 软件对序列长度、保守位点、变异位

点和信息位点等序列特征进行分析; 用 MEGA 5.1 软件中的 Kimura-2-parameter(K2P)模型计算遗传距离<sup>[14]</sup>, 构建距离矩。以虎皮香菇(*Lentinus tigrinus*)为外群, 用邻接(neighbor-joining method, N-J)法构建种质资源间的聚类图。

1.2.4 黑木耳 18S rDNA 二级结构预测 用 RNA-structure<sup>[15]</sup>、DNASTar<sup>[16]</sup> 等绘制其二级结构, 并用 Rnaviz 软件显示。

表 1

木耳菌株及来源

Table 1

The tested strains of *Auricularia auricular-judae* and origins

菌株名 Strain name	编号 No.	种名 Species name	来源 Origin	栽培种/野生菌株 Cultivars/Wild strain
“长城 1 号” ‘Changcheng 1#’	ME1	<i>Auricularia auricular-judae</i>	中国东北 Northeast China	栽培种 Cultivar
“木耳 7 号” ‘Mu'er 7#’	ME2	<i>Auricularia auricular-judae</i>	中国东北 Northeast China	栽培种 Cultivar
“小黑木耳” ‘Xiaoheimu'er’	ME3	<i>Auricularia auricular-judae</i>	中国东北 Northeast China	栽培种 Cultivar
“延明 1 号” ‘Yanning 1#’	ME4	<i>Auricularia auricular-judae</i>	中国东北 Northeast China	栽培种 Cultivar
“白背黑木耳” ‘Baibeiheimu'er’	ME5	<i>Auricularia auricular-judae</i>	中国东北 Northeast China	栽培种 Cultivar

## 2 结果与分析

### 2.1 木耳菌株 18S rDNA 序列 PCR 扩增产物

5 个木耳菌株 18S rDNA 的 PCR 扩增序列长度约在 1 000~2 000 bp 之间, PCR 条带清晰明显(图 1)。

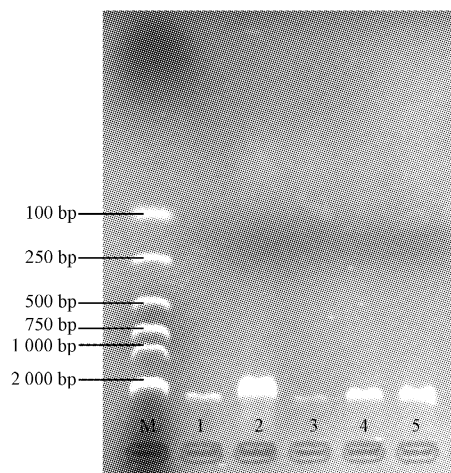


图 1 5 个木耳菌株 18S rDNA-PCR 扩增电泳图

注: M; 标准 DNA Marker DL 2 000, 1~5; 样品。

Fig. 1 Amplification profile of electrophoretogram

18S rDNA-PCR of 5 strains of

*Auricularia auricular-judae*

Note: M; standard DNA Marker DL 2 000, 1~5; material.

### 2.2 木耳菌株 18S rDNA 序列的差异性分析

用 DNAMAN 对黑木耳菌株正向、反向测序结果进行分析, 18S rDNA ITS 区长度约为 1 780 bp, 去除两端测序质量不好的区域后长度为 1 695 bp, GC 含量相差不大, 在 48.02%~48.32% 之间, 表明测序结果可靠。有变异位点 25 个, 其中信息位点 10 个分别是 491、558、

622、623、628、673、993、994、1 151、1 152 位点(表 2), 分别占总序列的 1.48% 和 0.59%, 保守位点为 1 670 bp, 占总序列的 98.53%。菌株间 18S rDNA 变异类型主要为碱基的颠换、转换。其中, 17 位点发生了碱基颠换; 8 位点发生了碱基转换; 整个 18S rDNA 序列变异位点主要集中在 538~628 bp 区域, 18S rDNA 区表现为中度保守区。

### 2.3 黑木耳菌株的遗传多样性分析

来源于 GenBank 的木耳属 2 个种 *Auricularia auricular-judae* (JN712676)、*Auricularia polytricha* (HM347337) 以及口蘑科香菇属中虎皮香菇(*Lentinus tigrinus*)和供试 5 个黑木耳菌株的 18S rDNA 序列遗传距离及序列距离矩阵构建见表 3, 采用 MEGA 5.1 软件中的 Kimura-2-parameter 模型进行计算, 不同菌株间的遗传距离为 0.001~0.040, 木耳属内各种的遗传距离变化范围 0.001~0.014, 遗传多样性小, “长城 1 号”/ME1 与“小黑木耳”/ME3 在所分析的 18S rDNAs 序列差异最小, 亲缘关系最近。由表 3 可知, 18S rDNA 系统分类与传统分类是一致性, 即遗传距离为科内大于属内, 属内大于种内。

### 2.4 系统发育聚类分析

以 NCBI 中口蘑科香菇属中 *Lentinus tigrinus* 的 18S rDNA 序列为聚类外群, 依据 18S rDNA 遗传距离、采用 N-J 法构建系统树, 自举检测 1 000 次(图 2)。从图 2 可以看出, 系统树中 6 个黑木耳在一个分支(A), 其构成了整个进化树核心, 表明几个菌株间亲缘关系非常接近, 与其在生物学形态上是一个种相吻合, 其中“长城 1 号”/ME1 与“小黑木耳”/ME3 菌株聚在一起, 有可能是同一菌株的不同名称, 毛木耳单独聚为一支(B)类。

表 2 木耳菌株 18S rDNA 序列变异位点的比较

Table 2		Comparison of variable sites ITS sequence of 5 strains of <i>Auricularia auricula-judae</i>																											
序号	菌株名称	各位点碱基 Base at different sites																										GC 含量	
No.	Strain name	491	538	539	540	541	542	558	578	597	599	604	606	607	613	615	621	622	623	628	673	993	994	1 073	1 151	1 152	GC content/%		
1	“长城 1 号” ‘Changcheng 1 #’	T	G	C	G	C	C	G	T	C	A	C	G	C	G	T	C	G	T	G	G	C	G	T	C	A	48.20		
2	“木耳 7 号” ‘Mu’er 7 #’	.	T	A	A	G	.	T	G	G	G	.	.	.	A	.	.	T	G	C	T	T	C	C	T	C	48.08		
3	“小黑木耳” ‘Xiaoheimu’er’	.	T	A	.	.	G	.	.	G	G	A	C	G	.	.	T	.	.	C	T	.	.	C	.	.	48.14		
4	“延明 1 号” ‘Yanming 1 #’	A	T	A	.	.	.	T	.	G	G	.	.	.	.	G	.	T	G	.	.	T	C	C	T	C	48.02		
5	“白背黑木耳” ‘Baibeihemu’er’	A	T	A	.	.	.	T	.	G	G	.	.	.	.	.	.	T	G	.	.	T	C	C	T	C	48.32		

注:…为碱基相同。Note:…Same bases.

表 3 不同木耳菌株间的遗传距离

Table 3		Genetic distance among different strains of <i>Auricularia auricula-judae</i>							
		菌株间的遗传距离 (Genetic distance among different strains)							
菌株名	Strains names	“白背黑木耳”	“延明 1 号”	“木耳 7 号”	“长城 1 号”	“小黑木耳”	黑木耳	毛木耳	香菇
		“Baibeihemu’er”	“Yanming 1 #”	“Mu’er 7 #”	“Changcheng 1 #”	“Xiaoheimu’er”	<i>Auricularia auricularia-judae</i>	<i>Auricularia polytricha</i>	<i>Lentinus tigrinus</i>
“白背黑木耳”“Baibeihemu’er”	—	—	—	—	—	—	—	—	—
“延明 1 号”“Yanming 1 #”	0.011	—	—	—	—	—	—	—	—
“木耳 7 号”“Mu’er 7 #”	0.007	0.010	—	—	—	—	—	—	—
“长城 1 号”“Changcheng 1 #”	0.008	0.005	0.009	—	—	—	—	—	—
“小黑木耳”“Xiaoheimu’er”	0.008	0.005	0.008	0.001	—	—	—	—	—
黑木耳 <i>Auricularia auricularia-judae</i>	0.010	0.005	0.009	0.004	0.003	—	—	—	—
毛木耳 <i>Auricularia polytricha</i>	0.014	0.010	0.013	0.008	0.007	0.004	—	—	—
香菇 <i>Lentinus tigrinus</i>	0.040	0.035	0.039	0.033	0.033	0.033	0.034	—	—

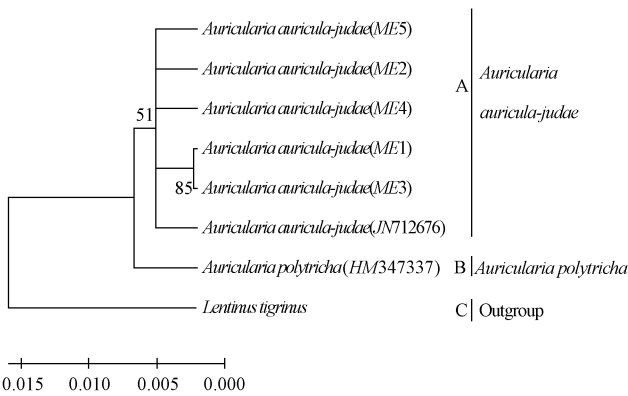


图 2 基于 18S rDNA 序列分析木耳菌株间的 N-J 系统树

Fig. 2 N-J phylogenetic tree of *Auricularia auricula-judae* strains based on 18S rDNA sequence analysis

2.5 黑木耳 18S rRNA 二级结构预测

为进一步了解木耳不同种类核糖体 18S rDNA 区序列在二级结构上的差异,现对“小黑木耳”/ME3 菌株、黑木耳 *Auricularia auricular-judae*(JN712676)以及毛木耳 *Auricularia polytricha* (HM347337) 主要变异区 (528~638 bp)进行了 RNA 二级结构预测和比较分析 (图 3、4)。从图 3、4 可以看出,由于序列长度没有差异,得到的茎环数量一样,小黑木耳 (Xiaoheimu’er)/ME4 菌株、黑木耳 *Auricularia auricula - judae* (JN712676 ) 和 毛 木 耳 *Auricularia polytricha*

(HM347337) 茎环数都是 4 个茎环,2 个黑木耳在结构上没有差异,而毛木耳与黑木耳 18S rDNA 主要变异区二级结构存在差异,表现在第 3 茎环 70~90 bp 结构上差异,表现为属间差异。

ENERGY = -11.91 *Auricularia polytricha* (1 111);37.00,TFTT

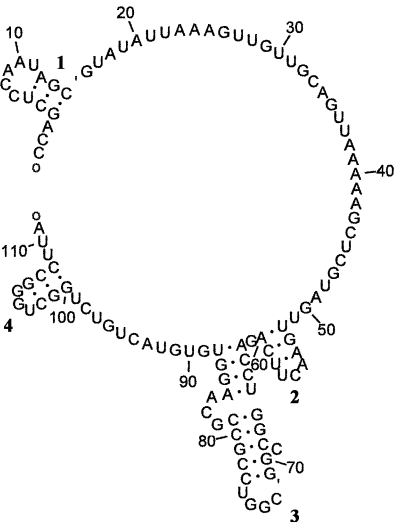


图 3 毛木耳 *Auricularia polytricha* (HM347337) 18S rDNA 变异区 RNA 二级结构

Fig. 3 The secondary structure of RNA sequence of *Auricularia polytricha* (HM347337)

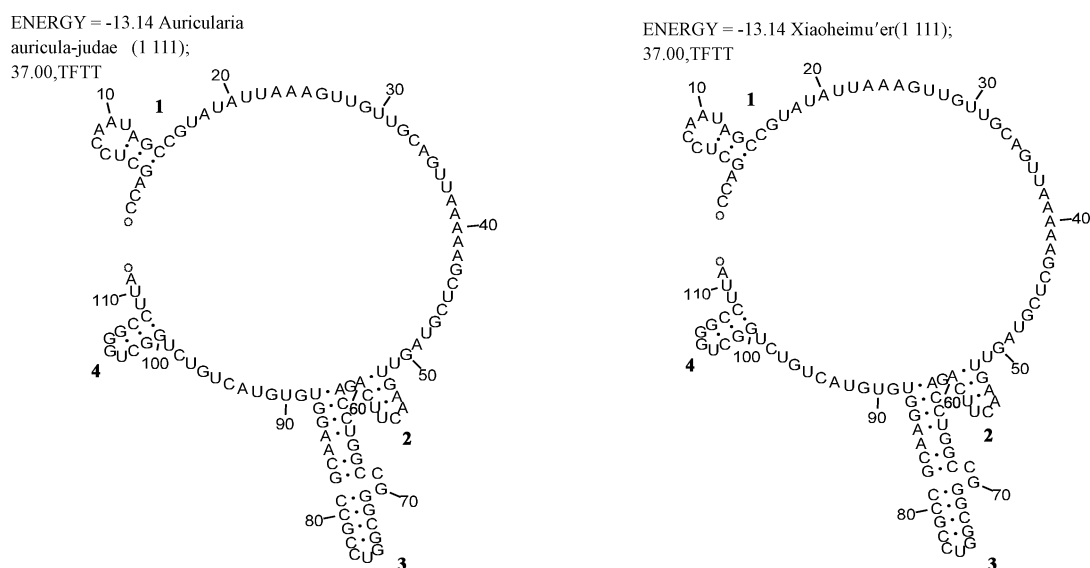


图4 黑木耳 *Auricularia auricular-judae*(JN712676)(左)和小黑木耳 ME3(右)18S rDNA 主要变异区 RNA 二级结构

Fig. 4 The secondary structure of RNA sequence of *Auricularia auricular-judae*(JN712676)(left) and *Auricularia auricular-judae*(ME4)(right)

### 3 讨论与结论

黑木耳是药食同源的大型真菌,对于高血糖、高血脂等心血管疾病有较好治疗作用<sup>[17]</sup>,因此是素有“素中之荤”之美誉的“黑色瑰宝”,其品种资源丰富多样<sup>[18]</sup>,但不同生境下的同物种表型差异大,仅根据形态分类鉴定有一定的局限性。核糖体 18S rDNA 区序列作为 DNA 条形码序列,非常保守,种间变化小,可以有效地将不同黑木耳菌株多样性展现出来,同时,可将近缘菌株、易混菌株区分开。18S rRNA 基因在蛋白质合成中具有重要的功能,其基因序列及二级结构高度保守,一般认为它比较适合用于研究高级阶元的系统发育<sup>[19]</sup>,用于亲缘关系较近的同属易混菌株的鉴定,可直观地区分木耳属的多种菌株,鉴别黑木耳的易混菌种。该试验测序的 5 个木耳菌株 18S rDNA 序列长度约为 1 700 bp,相似性比较菌株间 18S rDNA 序列差异不大,共有 25 个变异位点,系统聚类为一个大分支,可细分为 3 类,5 个黑木耳菌株地理来源一致,加之均为黑木耳菌种,遗传背景相似度非常高,遗传多样性单一,因此,在利用引进商业化栽培种时,要综合考虑,避免品质退化,带来经济损失。另从 RNA 二级结构信息差异研究也表明 18S rDNA 二级结构种间差异小,属间差异大,具有较强的种属间的差异性和序列保守性。

#### 参考文献

- [1] 黄年来,林志彬,陈国良,等. 中国食药菌[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2010.
- [2] Kirk P M, Canon P F, Minter D W, et al. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi[M]. 10th edition. CAB International, Wallingford, 2008.
- [3] 付达美,魏毅,肖郁惠,等. 黑木耳中的钐火焰原子吸收光谱[J]. 预防

医学情报杂志,2005,21(3):371-373.

- [4] Stock D W, Whitt G S. Evidence from 18S ribosomal RNA sequences that lampreys and hagfishes form a natural group[J]. Science, 1992, 257: 787-789.
- [5] 黄浩,许国权,周世力. 几种中国栽培灵芝品种的 RAPD 及 rDNA 分子标记鉴定[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2013, 41(2): 70-74.
- [6] 邓旺秋,宋斌,林群英,等. 短裙竹荪和白鬼笔 18S rDNA 部分序列及其系统学意义[J]. 菌物研究, 2004, 2(1): 35-39.
- [7] 廖德聪,陈强,李登煜,等. 四川省雅江松茸菌的分离与系统发育[J]. 生态学报, 2005, 25(4): 791-794.
- [8] 周会明. 杨柳田头菇生活史及分类地位研究[D]. 昆明:昆明理工大学, 2011.
- [9] 雷萍,吴亚召,张文隽,等. 秦巴山区桑黄 18S rDNA 的序列与亲缘关系分析[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2012, 42(4): 620-622.
- [10] 黄龙花,杨小兵,胡惠萍,等. rDNA 部分序列在食用菌进化关系研究中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(7): 1607-1610.
- [11] Matsumoto T, Obatake Y, Fukumasa - Nakai Y, et al. Phylogenetic position of Pholiota nameko in the genus Pholiota inferred from restriction analysis of ribosomal DNA[J]. Mycoscience, 2003, 44: 197-202.
- [12] Russo P, Juuti J T, Raudaskoski M. Cloning, sequence and expression of  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin-encoding gene in the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* [J]. Gene, 1992, 119: 175-182.
- [13] 李军. 生物软件选择与使用指南[M]. 北京:化学工业出版社, 2008.
- [14] 吴祖建,高芳奎,沈建国. 生物信息学分析实践[M]. 北京:科学出版社, 2010.
- [15] 许忠能. 生物信息学[M]. 北京:清华大学出版社, 2008.
- [16] 薛庆中. DNA 和蛋白质序列数据分析工具[M]. 北京:科学出版社, 2012.
- [17] 刘雅静,袁延强,刘秀河,等. 黑木耳营养保健研究进展[J]. 中国食物与营养, 2010(10): 66-69.
- [18] 李玉. 中国黑木耳[M]. 长春:长春出版社, 2001.
- [19] 刘自东,高学花. 拟步甲部分种核基因 18S rDNA 序列及分子系统学研究[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(19): 25-27.



# 樱桃荧光 AFLP 反应体系优化及应用

田长平<sup>1</sup>, 张福兴<sup>1</sup>, 刘晓静<sup>2</sup>, 张序<sup>1</sup>, 孙庆田<sup>1</sup>

(1. 烟台市农业科学研究院, 山东 烟台 265500; 2. 烟台市福山区果茶站, 山东 烟台 265500)

**摘要:**以 12 个甜樱桃品种和 4 个中国樱桃品种为试材, 对荧光 AFLP 分析过程中模板 DNA 的制备、酶切与连接、酶切连接产物的预扩增与选择性扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳等过程中易出现的问题及其解决方法进行了研究。结果表明:改良 CTAB 法提取甜樱桃嫩叶和老叶 DNA 效果均很好; 200 ng DNA 双酶切反应 4 h, 连接产物稀释 10 倍作为预扩增模板, 预扩增产物稀释 20 倍作为选择性扩增的模板; 筛选了 64 对引物, 其中 8 对扩增效果理想, 能够得到清晰、稳定的条带, 平均每对引物扩增条带为 40.6 条, 建立了樱桃 AFLP 分子标记技术体系; 该体系的建立为研究甜樱桃遗传多样性和标记重要农艺性状奠定了基础。

**关键词:**樱桃; 荧光 AFLP; 优化; 应用

**中图分类号:**S 662.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0115-04

甜樱桃(*Cerasus avium* L.)起源于欧洲, 在中国已有

**第一作者简介:**田长平(1983-), 男, 农艺师, 现主要从事樱桃栽培与育种等研究工作。E-mail: wenjun8341@163.com.

**责任作者:**孙庆田(1964-), 男, 研究员, 现主要从事樱桃栽培与育种等研究工作。E-mail: qingtiansun@126.com.

**基金项目:**山东省现代农业产业技术体系水果创新团队建设专项基金资助项目(SDAIT-03-022-02); 国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(200903019)。

**收稿日期:**2014-01-16

140 多年的栽培历史。尤其是近十年来, 樱桃产业在我国得到了迅速发展, 甚至成为一些地区的主导产业, 带动了经济的繁荣。但由于我国苗木繁育制度的不规范, 樱桃同名异物、同物异名等问题也日益突出, 由此引发的纠纷也逐渐增多。AFLP 分子标记技术具有多态性高、检测位点多、DNA 用量少的特点, 已在果树种质资源遗传多样性和亲缘关系分析、连锁图谱构建、基因定位、芽变鉴定等方面得到应用<sup>[1-4]</sup>。

有不少学者已经对苹果<sup>[5-7]</sup>、葡萄<sup>[8]</sup>、荔枝<sup>[9]</sup>等果树

## Analyses of Sequence Variation and Genetic Diversity on 18S rDNA Regions of *Auricularia auricula-judae*

GUI Ming-ying<sup>1</sup>, ZHAO Chun-yan<sup>1</sup>, WU Su-rui<sup>1</sup>, XIONG Yong<sup>2</sup>, GUO Xiang<sup>1</sup>

(1. Kunming Edible Fungi Institute, All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Kunming, Yunnan 650221; 2. Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry/State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Yunnan University of Nationalities, Kunming, Yunnan 650500)

**Abstract:** Used PCR method to amplify 18S rDNA regions of *Auricularia auricula-judae*s and sequenced them, and then used Clustalx 2, MEGA 5.0 software to analyze sequenced results and predict RNA secondary structure. These results revealed the genetic diversity of five *Auricularia auricula-judae*s from Northeast China in order to provide reference for cultivation introduction and new variety breeding. The results showed the length of amplification regions was 1 700 bp. After removed ends of the poor quality area, the length of 18S rDNA sequences was 1 695 bp. The contents of (G+C) were 48.02~48.32%. There were 25 variable sites and 10 parsimony-informative sites in the whole analyzed sequence. The variable sites mainly concentrated in 88~107 bp. The phylogenetic tree (N-J) showed 5 *Auricularia auricula-judae*s clustered into a branch, and *Auricularia polytricha* gathered in another. The 18S rDNA regions homology of *Auricularia* was consistent with that of traditional taxonomy. Nucleotide sequence combined with secondary structure of 18S rDNA region may provide some molecular structure information for the classification of *Auricularia auricular-judae*s.

**Key words:** *Auricularia auricular-judae*; 18S rDNA; genetic diversity; secondary structure