

# 基于 ITS 序列分析秦巴山区黑木耳菌株的遗传多样性

钱雪婷<sup>1</sup>, 陈文强<sup>1,2</sup>, 邓百万<sup>1,2</sup>, 解修超<sup>1,2</sup>, 彭浩<sup>1,2</sup>

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省食药食用菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723001)

**摘要:**通过黑木耳菌株的 ITS 序列分析, 对秦巴山区 44 个黑木耳菌株进行遗传多样性研究。采用 CTAB 法提取黑木耳菌株基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, 对扩增产物测序, 并通过软件 ClustalX 1.83 和 MEGA 5.0 进行序列比对以及系统发育树的构建。结果表明: 秦巴山区黑木耳菌株遗传多样性较丰富, 部分菌株之间同源性较高, 甚至可能为同一品种, 当相似系数为 0.002 时, 聚类为 5 个分支, 其中耳 268 与其它菌株亲缘关系较远, 为今后秦巴山区黑木耳菌株的遗传多样性及优良品种的遗传育种奠定了理论基础。

**关键词:**秦巴山区; 黑木耳; 形态特征; ITS; 遗传多样性

**中图分类号:**S 646.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)12-0147-05

黑木耳(*Auricularia auricular*), 分类上属担子菌纲、木耳目、木耳科、木耳属, 俗称木耳, 子实体一般较小, 胶质, 浅圆盘形、耳形或不规则形<sup>[1]</sup>, 主要富含蛋白质、氨基酸、糖类、纤维素及钙、磷、铁等矿物质元素<sup>[2]</sup>, 具有延缓衰老、增强体液免疫、止咳化痰等多种功效<sup>[3-5]</sup>。在中国, 黑木耳已有 1 400 多年的栽培历史<sup>[6]</sup>, 产量占世界总产量 70% 以上, 主要分为东北木耳和秦岭木耳。由于长期的人工驯化和自然选择, 黑木耳遗传背景越来越复杂, 因此对秦巴山区黑木耳菌株进行遗传多样性研究是十分必要的。

近年来, 随着分子生物学的发展, 国内外学者对黑木耳菌株的遗传多样性开展了大量研究。TANG 等<sup>[7]</sup>应用 ISSR 和 SRAP 分子标记对我国 34 个黑木耳栽培品种进行遗传多样性分析, 分别聚为 4 个和 5 个类群。刘华晶等<sup>[8]</sup>应用 ITS 序列分析对大兴安岭地区采集的 14 个野生黑木耳菌株和 6 个对照栽培种黑木耳菌株进行亲缘关系分析, 聚为 2 个类群。李媛媛等<sup>[9]</sup>应用 SCAR 标记技术对我国东北地区 50 株黑木耳栽培菌株进行遗传多样性分析。张旭等<sup>[10]</sup>应用 SRAP 和 ITS 分子标记对大兴安岭地区野生黑木耳菌株进行遗传多样性分析, 结果表明我国黑木耳菌株遗传多样性较高, 但

也存在黑木耳菌种、品名相对混乱等问题。

该研究通过对秦巴山区 44 个黑木耳菌株的 rDNA-ITS 区段进行序列测定和比较分析, 对 ITS 序列进行核苷酸序列数据库 GenBank 同源性检索比对, 构建系统发育树, 为基于形态学特征对黑木耳菌株的遗传多样性研究提供分子依据, 并结合黑木耳菌株不同的生长地域探讨黑木耳菌株的亲缘关系, 为黑木耳菌种管理、优良菌种选育以及种质资源信息库的研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

秦巴山区 44 个黑木耳供试菌株及来源见表 1。

固体培养基(CPDA): 20.0% 马铃薯, 2.0% 葡萄糖, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.3%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001% 维生素  $\text{B}_1$ , 1.2% 琼脂, pH 自然。液体摇瓶培养基(CPDA): 20.0% 马铃薯, 2.0% 葡萄糖, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.3%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001% 维生素  $\text{B}_1$ , 0.3% 蛋白胨, pH 自然。

高压蒸汽灭菌锅(MJ-54A 型, 上海施都凯仪器设备有限公司); 超净工作台(SW-CJ-2F 型, 苏州净化设备有限公司); 电泳仪(DYY-11 型, 北京市六一仪器厂); 高速冷冻离心机(Centrifuge 5424R, 德国 Eppendorf 公司); PCR 扩增仪(Mycycler, 美国 Bio-Rad 公司); 凝胶扫描成像系统(GelDoc, 美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 黑木耳菌丝形态特征的观察 配制 CPDA 培养基, 将活化好的黑木耳菌株分别接种于 3 个平皿, 28℃ 培养 10 d, 观察记录黑木耳菌丝形态、色泽、菌丝密度等特征, 并测量菌丝生长速度。

**第一作者简介:**钱雪婷(1990-), 女, 陕西汉中, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源利用开发。E-mail: qianxueting163@163.com.

**责任作者:**陈文强(1956-), 男, 陕西汉中, 教授, 现主要从事微生物资源的保护与利用等研究工作。E-mail: wenqiangc@126.com.

**基金项目:**陕西省科学技术研究发展计划资助项目(2014K01-16-03); 陕西省科技统筹创新工程计划资助项目(2012HBGC-20)。

**收稿日期:**2016-02-15

表 1

供试菌株及来源

Table 1

Tested strains and their locations

菌株名称	来源	收录号	菌株名称	来源	收录号
耳 266	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964853	商洛 Li	陕西商洛农科所	KT964876
耳 5#	陕西商洛农科所	KT964875	高产 1#	甘肃康县玉财食用菌开发有限公司	KT964862
分四	陕西略阳国兴地栽黑木耳研究所	KT964857	RF201	陕西宁强真菌研究所	KT964879
耳 91	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964883	耳 235	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964877
国兴 2#	陕西略阳国兴地栽黑木耳研究所	KT964856	野 1	甘肃康县玉财食用菌开发有限公司	KT964851
耳 238	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964884	甘 1	甘肃康县玉财食用菌开发有限公司	KT964858
耳 629	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964885	耳(袋)	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964859
耳菊 3#	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964887	112 冬	甘肃康县玉财食用菌开发有限公司	KT964871
新科 1#	陕西安康农科所	KT964865	耳 256	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964870
国兴 3#	陕西略阳国兴地栽黑木耳研究所	KT964872	36 号	甘肃康县玉财食用菌开发有限公司	KT964869
耳 1#	陕西商洛农科所	KT964864	耳 801	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964867
QD3#	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964888	耳 261	陕西宁强真菌研究所	KT964854
新科 5#	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964863	耳 3-18	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964880
新科 4#	陕西安康农科所	KT964874	A55	甘肃康县玉财食用菌开发有限公司	KT964855
国兴 1#	陕西略阳国兴地栽黑木耳研究所	KT964868	新科 6#	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964860
分六	陕西略阳国兴地栽黑木耳研究所	KT964882	新科 9#	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964881
LY16	陕西略阳农技中心·自主分离	KT964878	新科	陕西省食用菌工程技术研究中心	KF644429
耳冬梅 1#	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964886	耳 268	陕西省食用菌工程技术研究中心	KF644430
耳 269	陕西省食用菌工程技术研究中心	KT964852	QD4#	陕西省食用菌工程技术研究中心	KF644431
耳 3#	陕西商洛农科所	KT964866	耳 913	陕西省食用菌工程技术研究中心	KF644433
新耳 5#	陕西商洛农科所	KT964873	神农 A8	陕西省食用菌工程技术研究中心	KF644434
Au29	陕西安康农科所	KT964861	耳 97-2	陕西省食用菌工程技术研究中心	KF644435

1.2.2 样品制备和 DNA 提取 将活化好的黑木耳菌株接种于液体摇瓶培养基中,500 mL 三角瓶装液 200 mL,160 r·min<sup>-1</sup>,28 ℃振荡培养 8~10 d。采用 CTAB 法提取黑木耳菌株基因组 DNA<sup>[11]</sup>。将培养好的菌丝体用纱布过滤,蒸馏水冲洗,滤纸吸干水分,称重,放入研钵中,加入液氮充分研磨至粉末状,加 CTAB 2 mL,混匀;65 ℃水浴 1 h,每 15 min 翻转混匀 1 次;12 000 r·min<sup>-1</sup>,4 ℃离心 15 min;吸取上清,加 500 μL Tris 饱和酚、500 μL 氯仿-异戊醇(24:1),混匀,12 000 r·min<sup>-1</sup>,4 ℃离心 15 min(重复 2 次);吸取上清,加入 800 μL 无水乙醇,轻轻混匀,-20 ℃,30 min;12 000 r·min<sup>-1</sup>,4 ℃离心 15 min;弃上清,加 75%乙醇 1 mL,12 000 r·min<sup>-1</sup>,4 ℃离心 10 min(重复 2 次),弃上清,晾干;加 50 μL ddH<sub>2</sub>O,溶解 DNA,-20 ℃保存备用。

1.2.3 PCR 扩增和检测 选用真菌通用引物 ITS1、ITS4 (ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGC GG; ITS4: TCCTC CGCTTATTGATATGC),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。ITS-PCR 扩增体系:模板 DNA 2 μL,ITS1 2 μL,ITS4 2 μL,2 × Taq PCR Green Mix 25 μL,ddH<sub>2</sub>O 19 μL;ITS-PCR 扩增条件:95 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 1 min,57 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,共 33 个循环;72 ℃延伸 10 min;ITS-PCR 扩增产物的检测:配置 1%琼脂糖凝胶(TBE 缓冲液),取 PCR 产物 5 μL 进行点样、检测,于凝胶成像系统拍照,记录电泳结果。

1.2.4 系统发育树的构建 ITS-PCR 扩增产物测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。通过 Blast

检索比对,下载与供试菌株同源性较高的 ITS 序列,利用 MEGA 5.0 软件,采用非加权组平均法(UPGMA),构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑木耳菌株菌丝形态特征

秦巴山区 44 个黑木耳菌株接种于 CPDA 平皿中,28 ℃培养 10 d,观察菌丝形态特征,并测量记录菌丝生长速度。

表 2 秦巴山区黑木耳菌株菌丝形态特征

Table 2 Mycelia morphology in different *Auricularia auricular* strains

菌株名称	形态	色泽	密度	菌株名称	形态	色泽	密度
耳 266	绒毛状	白色	+++	Au29	绒毛状	白色	+
耳 5#	絮状	白色	++	高产 1#	绒毛状	白色	+++
分四	绒毛状	白色	++	RF201	絮状	浅灰色	+
耳 91	绒毛状	白色	+++	耳 235	绒毛状	白色	++
国兴 2#	绒毛状	白色	++	新科 1#	绒毛状	白色	++
耳 238	絮状	白色	++	甘 1	絮状	白色	++
耳 629	絮状	浅灰色	++	耳(袋)	绒毛状	白色	+++
耳菊 3#	絮状	白色	++	112 冬	绒毛状	白色	++
野 1	絮状	白色	++	耳 256	绒毛状	白色	++
国兴 3#	绒毛状	白色	++	36 号	绒毛状	白色	+++
耳 1#	絮状	白色	++	耳 801	绒毛状	白色	+++
QD3#	絮状	浅灰色	++	耳 261	绒毛状	白色	+++
新科 5#	绒毛状	白色	++	耳 3-18	绒毛状	白色	++
新科 4#	绒毛状	白色	++	A55	绒毛状	白色	+++
国兴 1#	绒毛状	白色	+++	新科 6#	絮状	白色	++
分六	絮状	白色	++	新科 9#	絮状	白色	++
LY16	绒毛状	白色	+++	新科	绒毛状	白色	++
耳冬梅 1#	绒毛状	白色	++	耳 268	绒毛状	白色	++
耳 269	绒毛状	浅灰色	++	QD4#	絮状	浅灰色	+
商洛 Li	绒毛状	白色	+++	耳 913	绒毛状	浅灰色	++
耳 3#	絮状	白色	++	神农 A8	绒毛状	白色	+++
新耳 5#	绒毛状	白色	+++	耳 97-2	絮状	白色	++

注:十表示菌丝稀疏;++表示菌丝较浓;+++表示菌丝浓密。

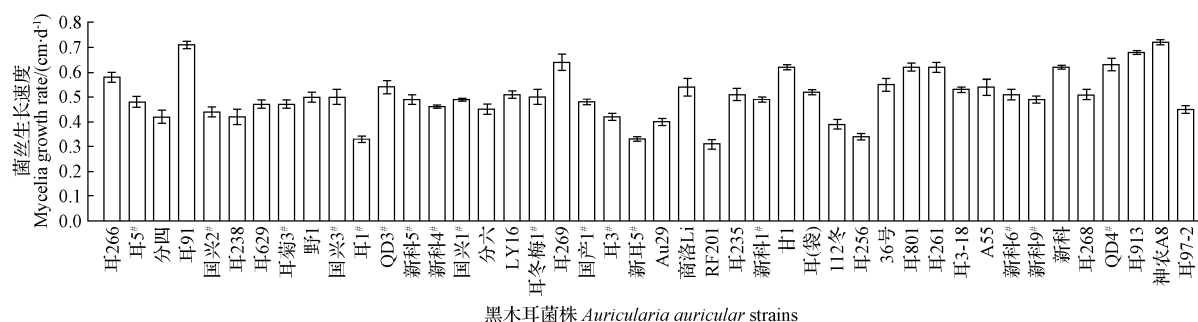


图1 黑木耳菌株菌丝生长速度

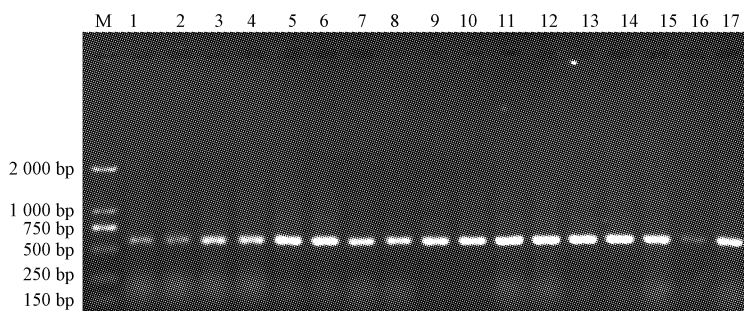
Fig. 1 Mycelia growth rate in different *Auricularia auricular* strains

表2、图1表明,秦巴山区44个黑木耳菌株中,耳266、耳91、国兴2#、国兴3#、新科4#、国兴1#、LY16、耳冬梅1#、耳269、A55、耳3-18、耳261、耳801、36号、112冬、耳235、商洛Li、Au29、新耳5#、高产1#、耳268、神农A8、耳913、分四、新科1#、耳(袋)、新科5#、耳256、新科菌丝呈绒毛状,耳5#、耳238、耳629、耳菊3#、野1、耳3#、RF201、甘1、耳1#、QD3#、分六、新科9#以及新科6#、QD4#、耳97-2菌丝呈絮状;耳629、RF201、QD3#、耳269、QD4#、耳913菌丝呈浅灰色,其余均呈白色;耳

266、耳91、高产1#、新耳5#、商洛Li、耳(袋)、国兴1#、LY16、36号、A55、耳261、耳801、神农A8菌丝浓密,Au29、RF201、QD4#菌丝稀疏;耳91、耳269、甘1、新科、神农A8、耳913等菌株菌丝生长速度较快,RF201、新耳5#、耳1#、耳256等菌株菌丝生长速度较慢。

## 2.2 黑木耳菌株 ITS-PCR 扩增产物电泳结果

秦巴山区部分黑木耳菌株的基因组DNA经ITS-PCR扩增,利用1%琼脂糖凝胶(TBE缓冲液)电泳进行检测。



注:泳道1~17为秦巴山区部分黑木耳菌株ITS-PCR扩增产物;M为DNA Marker。

图2 ITS-PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of ITS-PCR amplification products

由图2可知,秦巴山区部分黑木耳菌株基因组DNA经ITS-PCR扩增,获得单一条带,产物序列片段长度大小为500~750 bp。ITS-PCR扩增产物序列测定委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成,通过NCBI网站,将44条序列分别进行Blast比对分析,初步证实均为黑木耳菌株。

## 2.3 系统发育树的构建

将44条序列提交给NCBI公共数据库GenBank,获得秦巴山区44个黑木耳菌株的收录号(表1)。通过Blast检索比对,得到32个与供试菌株同源性较高的ITS序列,利用ClustalX 1.83软件对供试菌株ITS序列以及相似序列进行多重比对。利用MEGA 5.0软件,采用非加权组平均法(UPGMA),构建系统发育树(图3)。

图3表明,秦巴山区44个黑木耳菌株遗传多样性

较丰富,部分菌株同源性较高。当相似系数为0.002时,可将供试菌株聚为5个分支,A55、36号、甘1、耳913、耳238、耳266、耳629、耳菊3#、新科4#、商洛Li、耳801、耳261、耳91、耳5#、LY16#与标准菌株*Auricularia auricula-judae* strain NAAS02134(JN043322)等聚为1个分支;新耳5#、高产1#、耳1#、国兴2#、耳3-18、国兴1#、耳3#、新科1#、木耳(袋)、112冬、新科6#与标准菌株*Auricularia auricula-judae* strain HF-1(GQ168486)等聚为1个分支;耳268聚为1个分支;耳冬梅1#、国兴3#、野1、分四、分六、耳256与标准菌株*Auricularia auricula-judae* strain HF-8(GQ168492)等聚为1个分支;耳97-2、神农A8、QD3#、RF201、QD4#、新科5#、耳269、Au29、耳235、新科、新科9#与标准菌株*Auricularia auricula-judae* strain JGDQ(HQ388365)等聚为1个分支。

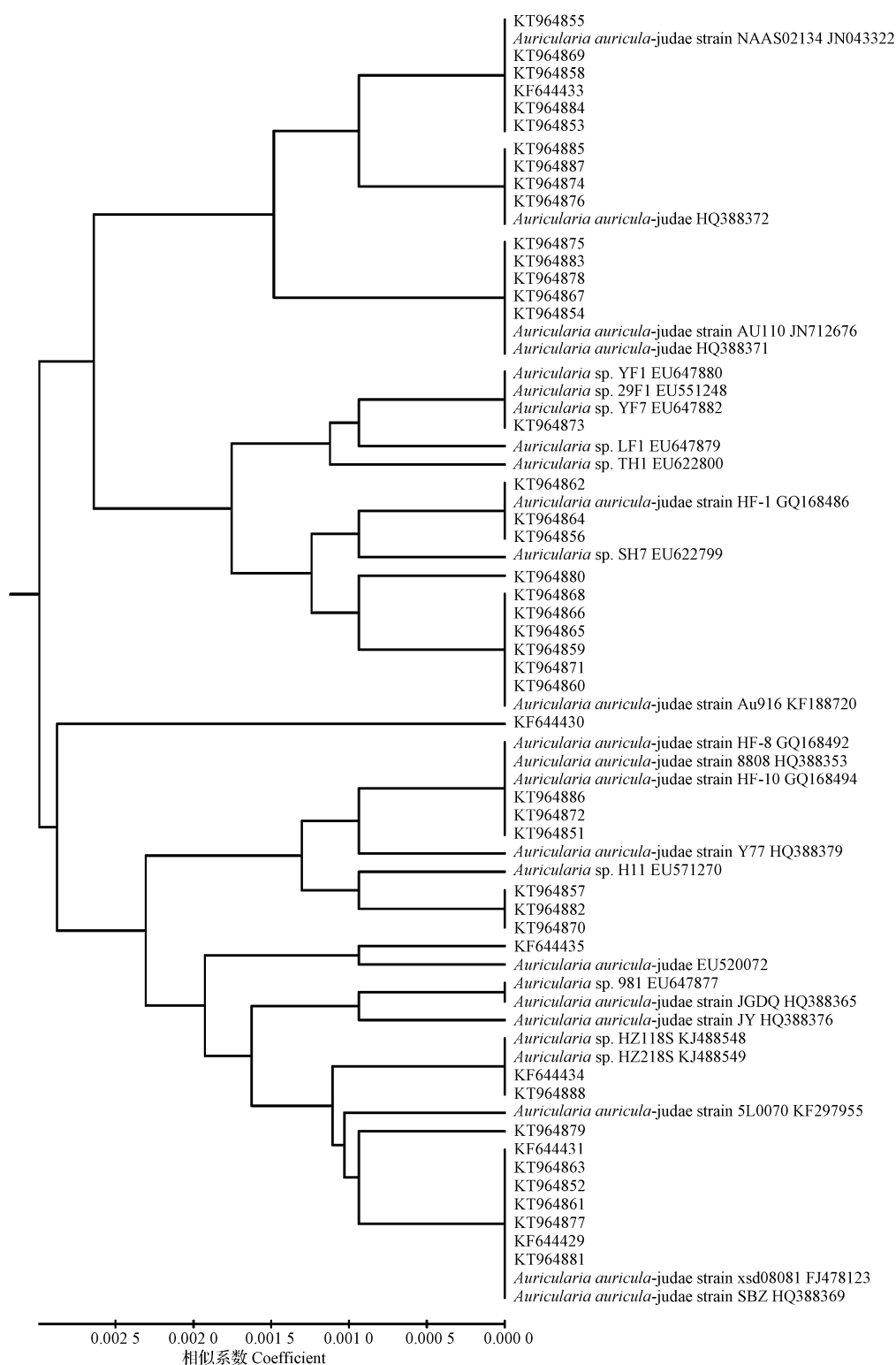


图3 基于ITS序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on ITS sequences

### 3 结论与讨论

近几年,我国黑木耳产业发展迅速,为扩大生产规模、选育优良品种,需要对不同黑木耳菌株的生长条件以及亲缘关系进行分析研究。由于黑木耳的形态和品

质容易受时间、环境以及生理特性等因素的影响<sup>[12-13]</sup>,使基于形态学对黑木耳菌株进行分类研究的结果不够准确。ITS序列是rDNA中介于18S和5.8S之间的ITS1、5.8S和28S之间的ITS2的非编码转录间隔区,进



化速度较快,具有较高的可变性,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<sup>[14-15]</sup>。

该研究将秦巴山区 44 个黑木耳菌株接种于 CPDA 培养基中,观察菌丝形态分别呈绒毛状、絮状;色泽主要呈白色,少数呈现浅灰色;浓密度各有差异;生长速度介于  $0.31 \sim 0.72 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。ITS 序列比较分析表明,秦巴山区黑木耳菌株遗传多样性较丰富,当相似系数为 0.002 时,聚类为 5 个分支,其中耳 268 独自聚为 1 个分支,表明与其它黑木耳菌株的亲缘关系较远,其它 4 个分支中均包含不同地域的黑木耳菌株,如秦巴山区黑木耳菌株耳 97-2、神农 A8、QD3<sup>#</sup>、RF201、新科 5<sup>#</sup>、耳 269、Au29、耳 235、新科、新科 9<sup>#</sup> 与黑龙江地区黑木耳菌株 *Auricularia* sp. 981(EU647877)、*Auricularia auricula*-judae strain JDGQ(HQ388365)以及江苏地区黑木耳菌株 *Auricularia auricula*-judae strain xd08081(FJ478123)等标准菌株聚类在 1 个分支上,表明这些菌株之间亲缘关系较近,甚至不同地域的不同菌株可能为同一品种。与王进等<sup>[16]</sup>对秦巴山区黑木耳主要栽培种的亲缘关系研究相比,该研究选用的供试菌株地域及数量更广泛、更全面,系统发育树的聚类结果更精确、更详细。

通过黑木耳菌株的形态特征以及构建 ITS 序列系统发育树,分析了秦巴山区 44 个黑木耳菌株的遗传多样性,并初步探讨了与我国其它地域黑木耳菌株之间的亲缘关系,为黑木耳资源评价及遗传育种研究提供理论依据。对秦巴山区 44 个黑木耳菌株进行优良菌株选育以及扩大栽培生产试验还有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 卯晓岚. 中国草菌[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [2] 范金波, 侯宇, 周素珍, 等. 超声波辅助酶法提取黑木耳多糖工艺条件优化[J]. 食品与发酵科技, 2014, 50(5): 31-35.

- [3] PENG X B, LI Q, OU L N, et al. GC-MS, FT-IR analysis of black fungus polysaccharides and its inhibition against skin aging in mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47(2): 304-307.
- [4] NGUYEN T L, WANG D, HU Y, et al. Immuno-enhancing activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides[J]. Carbohydr Polym, 2012, 89(4): 1117-1122.
- [5] 刘军, 王昕. 黑木耳多糖的止咳化痰药理作用研究[J]. 实用药物与临床, 2015, 18(2): 186-188.
- [6] 李辉平, 黄晨阳, 陈强, 等. 黑木耳栽培菌株的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 935-940.
- [7] TANG L, XIAO Y, LI L, et al. Analysis of genetic diversity among Chinese *Auricularia auricula* cultivars using combined ISSR and SRAP markers[J]. Curr Microbiol, 2010, 61(2): 132-140.
- [8] 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.
- [9] 李媛媛, 隋玉龙, 牛淑力, 等. SCAR 标记在黑木耳栽培菌株分类鉴定中的应用[J]. 菌物研究, 2013, 11(3): 182-185, 189.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 徐彦军, 吴秀泉, 宋世良, 等. 不同速生树种培养料对黑木耳生长及产量的影响[J]. 北方园艺, 2013(10): 143-145.
- [13] 张介驰, 韩增华, 张丕奇. 发菌温度对黑木耳菌丝和子实体生长的影响[J]. 食用菌学报, 2014, 21(2): 36-40.
- [14] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version 4. 0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596-1599.
- [15] GLEN M, TOMMERUP 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.
- [16] 王进, 陈文强, 邓百万, 等. 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[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(5): 535-541.

## Analysis of the Genetic Diversity of *Auricularia auricular* Strains From Qinba Mountains Based on ITS Sequence

QIAN Xueting<sup>1</sup>, CHEN Wenqiang<sup>1,2</sup>, DENG Baiwan<sup>1,2</sup>, XIE Xiuchao<sup>1,2</sup>, PENG Hao<sup>1,2</sup>

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000; 2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong, Shaanxi 723001)

**Abstract:** Genetic diversity among different strains were researched by analyzing the morphological characters and ITS sequence of 44 *Auricularia auricular* strains from Qinba Mountains. Using CTAB method to extract genomic DNA, amplifying and sequencing PCR products. The software ClustalX and MEGA 5.0 were applied to sequence alignment and phylogeny analysis. The results showed that plentiful genetic diversity among different strains was found, while the homology of parts of *Auricularia auricular* strains was high. Based on the similarity coefficient about 0.002, the strains were separated into five groups. The genetic relationship between *Auricularia auricula*-judae 268 and others were quite far.

**Keywords:** Qinba Mountains; *Auricularia auricular*; morphological characters; ITS; genetic diversity