

张 健, 张国权, 邹 莉, 等. 大球盖菇的分离纯化及 ITS 序列鉴定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 120–123.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.034

# 大球盖菇的分离纯化及 ITS 序列鉴定

张 健<sup>1</sup>, 张国权<sup>1</sup>, 邹 莉<sup>1</sup>, 张志光<sup>2</sup>

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省孙吴县林业局, 黑龙江黑河 164200)

**摘要:**以吉林长白山地区的野生大球盖菇为材料, 对其进行 1~5 h 不同时间的晾晒处理, 采用组织分离法分别对其菌盖、菌盖与菌柄交接处、菌柄上端和菌柄基部的组织进行分离纯化, 通过测定菌丝生长速度、生长势和污染率等, 筛选出分离纯化的最适晾晒时间和最佳部位; 设置 5 种液体培养基配方培养液体菌种, 通过测定菌丝体生物量、菌丝球密度和形态, 筛选出最佳的液体培养基配方; 最后将分离物进行 ITS 序列分析, 计算遗传距离, 并采用邻接法构建 NJ 系统发育树。结果表明, 分离纯化最适晾晒时间为 2 h, 最佳分离部位为菌盖与菌柄交接处, 此种情况下菌丝生长速度最快, 菌丝长势最好, 污染率最低; 最佳的液体培养基配方为 A2, 菌丝体生物量最高, 菌丝球密度最大, 形态最好; 最后分离菌株经 ITS 序列测定, 系统发育分析证实其为大球盖菇。

**关键词:**大球盖菇; 组织分离; ITS 序列分析; 系统发育分析

**中图分类号:** S646.904 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0120-03

大球盖菇 (*Stropharia rugosoannulata*) 别称酒红球盖菇、皱环球盖菇, 属担子菌门 (Basidiomycota) 层菌纲 (Hymenomycetes) 伞菌目 (Agaricales) 球盖菇科 (Strophariaceae) 球盖菇属 (*Stropharia*), 是国际菇类交易市场上十大菇类之一, 也是联合国粮农组织 (FAO) 向发展中国家推荐栽培的特色食用菌之一<sup>[1]</sup>。大球盖菇鲜菇色泽艳丽, 肉质脆嫩滑爽, 干品气味清香, 营养丰富, 具有很高的食用价值和药用价值, 颇受国内外消费者欢迎, 具有非常广阔的发展前景。大球盖菇的栽培管理较为粗放, 对其冬闲田露地栽培<sup>[2]</sup>、大棚反季节栽培<sup>[3]</sup>、畦式栽培、层架式栽培、地坑式栽培等<sup>[4]</sup>多种栽培模式进行深入研究, 对利用稻草、玉米秸秆、菌渣等不同栽培料栽培大球盖菇也进行多样化比较<sup>[5-8]</sup>, 取得了丰富的研究成果, 但关于大球盖菇母种的获得、液体培养基配方的筛选以及如何对菌种进行准确鉴定还未见报道。ITS (internal transcribed spacer) 是核糖体内转录间隔区, 包括 ITS1 和 ITS2 两部分, 连同二者中间的 5.8S rDNA 基因组成 ITS1-5.8S-ITS2 结构, 被广泛应用于真菌菌种鉴定、系统发育、条形码和群体多样性研究<sup>[9]</sup>。本研究对采自吉林长白山地区的野生大球盖菇进行组织分离, 获取母种, 筛选最适合液体菌种生长的培养基配方, 并对子实体和分离菌株的 ITS 序列进行测序比对, 构建系统发育树, 旨在从分子水平上对大球盖菇进行鉴定, 进而为大球盖菇的开发和利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

收稿日期: 2015-11-29

基金项目: 黑龙江省哈尔滨市科技创新人才基金 (编号: 2015RQQXJ049)。

作者简介: 张 健 (1978—), 女, 黑龙江伊春人, 博士, 工程师, 主要从事食用菌方向研究。

通信作者: 邹 莉, 博士, 教授, 主要从事资源微生物方向研究。

E-mail: shyj@nefu.edu.cn。

大球盖菇子实体于 2015 年 9 月采自吉林省长白山地区。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 培养基的制备** 研究使用的分离培养基为 PDA 培养基, 培养基制作方法如下: 将马铃薯洗净去皮, 用电子天平称取 200 g 切成 1 cm<sup>3</sup> 的小块, 用纱布包好后放入 1 000 mL 水中煮沸; 待马铃薯块软化后捞出, 加入葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 再次煮沸, 加水补足 1 000 mL; 再用双层纱布过滤, 倒入锥形瓶内; 将瓶口用封口膜封好后, 用高压灭菌锅 121 ℃ 灭菌 20 min; 灭菌结束后, 待培养基温度降至不烫手但未凝固时, 在超净工作台内, 定量倒入直径为 8 cm 的培养皿中, 装液量为 20 mL, 凝固后备用。

**1.2.2 子实体晾晒时间对分离的影响** 以刚采集到的部分野生大球盖菇新鲜子实体作为对照, 将大球盖菇放置在充足阳光下晾晒, 晾晒时间为 10:00—15:00, 分别取晾晒 1、2、3、4、5 h 的子实体和新鲜子实体进行组织分离。将菌盖从中间撕开, 挑取 0.3 cm 大小的菌肉组织接于 PDA 平板培养基中心部位, 每个平板接 1 块菌肉, 盖盖后用封口膜封好, 每组设置 10 个重复, 放置在 25 ℃ 恒温培养箱中进行培养, 每天观察菌肉组织的萌发、污染以及菌丝生长情况。

**1.2.3 子实体不同部位对分离的影响** 将分离要使用的解剖刀、镊子、封口膜以及 PDA 平板放入超净工作台中进行紫外灭菌。将大球盖菇经处理后分离效果最好的子实体, 用 75% 乙醇擦拭表面 2~3 遍, 用无菌的解剖刀在菌盖顶部中间划口, 用手撕开, 注意避免手接触到内部的菌肉。用解剖刀分别在子实体菌盖、菌盖与菌柄交接处、菌柄上端和菌柄基部划取一小块组织, 用无菌镊子夹起, 迅速放置于制备好的 PDA 平板培养基中心处, 每个平板接 1 块组织, 每组设置 10 个重复, 封口膜封口后置于 25 ℃ 恒温培养箱中进行培养, 每天观察并记录组织体的萌发情况、污染情况和菌丝生长情况。

**1.2.4 液体培养基的制备** 研究共采用 5 种液体培养基研究培养基对菌丝生长的影响, 各培养基制作方法如下。

(1) 基础液体培养基 A1。将马铃薯洗净去皮, 称取

300 g,切成 1 cm<sup>3</sup> 小块,用纱布包好后放入 1 500 mL 水中煮沸;待马铃薯块软化后捞出,加入 30 g 葡萄糖、1.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 0.75 g MgSO<sub>4</sub>,再次煮沸;加水补足 1 500 mL,再用双层纱布过滤,倒入 500 mL 锥形瓶内,每个锥形瓶分装 300 mL 液体培养基;封口膜封口后,放入高压灭菌锅内,121 ℃ 灭菌 30 min 以备用。(2)加富液体培养基 A2。基础液体培养基 A1 + 15 g 蛋白胨。(3)加富液体培养基 A3。基础液体培养基 A1 + 15 g 尿素。(4)加富液体培养基 A4。基础液体培养基 A1 + 15 g 酵母膏。(5)加富液体培养基 A5。基础液体培养基 A1 + 15 g 硫酸铵。

1.2.5 不同液体培养基配方对菌丝生长的影响

1.2.5.1 菌块培养及液体培养基接种培养 将由同一子实体的同一部位分离获得的母种进行扩繁,接种于新的 PDA 平板培养基中心,待菌丝长满整个平板培养基后,用直径为 5 mm 灭过菌的打孔器在距平板中心接种点 3 cm 处打孔,将菌龄一致的菌块转接到液体培养基中,每瓶液体培养基接入菌块 10 块,每个配方设置 5 个重复。将接入菌块的液体培养基锥形瓶放入恒温振荡器内,在 25 ℃、130 r/min 的条件下培养 10 d,观察菌丝球形态。

1.2.5.2 生物量的测定 取 50 mL 液体菌种,2 000 g 离心 20 min,去上清;菌丝体沉淀经蒸馏水充分洗涤后,滤纸过滤;待滤液无色透明后收集菌丝体,80 ℃ 真空干燥至恒质量,电子天平准确称质量。计算公式为:

菌丝体生物量(g/L) =  $\frac{\text{菌丝体干质量(g)}}{0.05(\text{L})} \times 1\,000$ 。

1.2.5.3 菌丝球密度的测定 将培养至 10 d 的液体菌种摇匀后,用移液器吸取 1 mL 的菌液,加入 9 mL 的无菌水中,稀释 10 倍,测定菌丝球个数。

1.2.6 DNA 的提取 采用快捷型植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根)分别对大球盖菇的子实体和分离培养得到的菌丝体进行基因组 DNA 提取。将大球盖菇子实体撕开用灭过菌的镊子夹取内部完好的菌肉,放于研钵中,加入液氮充分研磨;菌丝体采用锥形瓶中的液体菌种,经纱布过滤后,用无菌水冲洗 3~5 遍,将菌丝拧干,取适量放于研钵中,加入液氮充分研磨。其余步骤参照说明书。

1.2.7 ITS 序列的扩增 采用通用引物 ITS1 和 ITS4(ITS1: 5′ - TCCGTAGGT - GAACCTGCGG - 3′; ITS4: 5′ - TCCTC-CGCTTATTGATATGC - 3′)用于 rDNA ITS 区段的 PCR 扩增<sup>[10]</sup>。扩增体系为 50 μL,其中 35.5 μL 去离子水,5 μL 10 × PCR buffer,4 μL dNTPs(2.5 mmol/L),ITS1/ITS4 引物各 2 μL,0.5 μL Taq DNA 酶(5 U/μL),1 μL 模板 DNA(浓度 20~50 mg/L)。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,35 个循环;72 ℃ 反应 7 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后 4 ℃ 保存。

1.2.8 ITS 序列的测序与分析 为了保证测序的准确率,PCR 产物经胶回收纯化后用正反向引物双向测序,测序由哈尔滨博仕生物技术有限公司完成。

将测序结果在 NCBI 中作 BlastN 比对,找出并下载 >90% 相似性序列,用 ClustalX2.1 的 Alignment 程序对所有同源序列进行多重对位排列。用 MEGA 5.02 软件进行系统发育分析和进化树的构建。用 Kimura2 - parameter 模式计算

遗传距离,所有对位排列结果中的空位(gaps)或缺失数据(missing data)作完全删除(complete deletion)处理,进化距离分析采用邻位相连法(NJ,neighbor - joining)。系统树每个分支的统计学显著性分析以自展法(bootstrap)进行检验,重复次数为 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 子实体晾晒时间对分离的影响

由表 1 可知,分离新鲜子实体污染率达到了 30%,而经过晾晒 1 h,污染率降低至 10%,晾晒 2~5 h,污染率降为 0。晾晒时间越长,萌发越慢,新鲜子实体和晾晒 1~2 h 的子实体分离时,萌发最快,只需 2 d;晾晒 5 h 时,分离的菌肉组织不萌发。晾晒时间越长,菌丝生长越慢,晾晒 2 h 的子实体分离后,菌丝生长速度最快,为 8.0 mm/d,但与新鲜子实体和晾晒 1 h 的子实体差别不大。新鲜子实体和晾晒 1~2 h 的子实体,菌丝生长浓密,长势旺盛;但晾晒 3 h 之后,菌丝变得稀疏,长势较弱。综上所述,采用晾晒 2 h 的大球盖菇子实体进行分离,既能有效地降低污染率,又不影响萌发和菌丝的生长。

表 1 子实体晾晒时间对分离的影响

晾晒时间 (h)	污染率 (%)	萌发时间 (d)	菌丝平均生长 速度(mm/d)	菌丝生长势
0	30	2	7.8	+++
1	10	2	7.7	+++
2	0	2	8.0	+++
3	0	4	7.0	++
4	0	6	6.6	+
5	0	不萌发	—	—

注:菌丝生长浓密、长势旺盛,用“+++”表示;菌丝生长较密,长势较好,用“++”表示;菌丝生长稀,长势较弱,用“+”表示。下同。

2.2 子实体不同部位对分离的影响

从表 2 可以看出,大球盖菇子实体菌盖与菌柄交接处分离后,菌丝的生长速度最快,达到 8.9 mm/d;其次是菌柄上端(8.5 mm/d)和菌盖(8.0 mm/d);菌柄基部最慢,仅为 7.4 mm/d。除菌柄基部外,其他 3 个部位菌丝的长势都很浓密旺盛;菌柄基部的污染率达到了 10%,其他 3 个部位污染率则为 0。综合分析,菌盖与菌柄交接处为最佳分离部位。

表 2 子实体不同部位对分离的影响

分离部位	生长速度 (mm/d)	菌丝长势	污染率 (%)
菌盖	8.0	+++	0
菌盖与菌柄交界处	8.9	+++	0
菌柄上端	8.5	+++	0
菌柄基部	7.4	+	10

2.3 不同液体培养基配方对菌丝生长的影响

如表 3 所示,不同的液体培养基配方上生长的菌丝存在很大差异。A2 的菌丝体生物量(6.8 g/L)和菌丝球密度(138 个/mL)均明显高于其他 4 组培养基;其次为 A4 培养基,菌丝体生物量为 5.5 g/L,菌丝球密度为 109 个/mL;A3 的菌丝体生物量和菌丝球密度则最小,分别为 3.7 g/L、65 个/mL。A2 和 A4 配方的菌丝球如小米粒大小,呈圆球状,大小均一,菌液稠密;其他 3 组配方的菌丝球都如绿豆粒大

小,呈刺球状,其中 A1 配方的菌丝球大小均一,菌液浓度较稠密;而 A3 和 A5 配方的菌丝球大小不均一,菌液浓度较稀疏。综上分析,采用 A2 培养大球盖菇菌丝体最佳,其次为 A4 培养基。

表 3 不同液体培养基配方对菌丝生长的影响

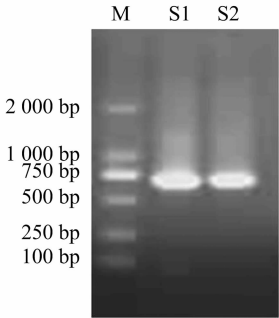
配方	菌丝体生物量(g/L)	菌丝球密度(个/mL)	菌丝球形态
A1	4.8	96	如绿豆粒,刺球状,大小均一,较稠密
A2	6.8	138	如小米粒,圆球状,大小均一,极稠密
A3	3.7	65	如绿豆粒,刺球状,大小不一,稀疏
A4	5.5	109	如小米粒,圆球状,大小均一,较稠密
A5	4.4	87	如绿豆粒,刺球状,大小不一,较稀疏

2.4 ITS 区段的 PCR 产物及测序

对大球盖菇子实体及分离培养得到的菌丝进行 DNA 提取,并以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,得到如图 1 所示的特异性条带。由图 1 可以看出,S1 与 S2 片段大小一致,约为 650 bp,与测序得到的基因片段长度 S1 (649 bp) 和 S2 (654 bp) 大小相符,并且 S1 与 S2 有 99% 的同源性。由此可以初步判定,菌丝体 S2 为大球盖菇子实体 S1 的纯培养菌丝体。

2.5 系统发育分析

在 NCBI 中进行 BLASTN 比对,找到 12 条与 S2 相似性 > 90% 的序列并下载,用 ClustalX2.1 软件进行序列比对,并辅以人工修正。以灵芝(*Ganoderma lucidum*)作为外参,基于来自 NCBI 中的 12 个种的 ITS 序列,连同试验中的 ITS 序列共 14 条序列一起用于系统发育分析。用 MEGA 5.02 中的邻接法(NJ)构建系统树。从图 2 可以看出,S2 与球盖菇属大球盖菇(*Stropharia rugosoannulata*)系统发育关系最近。



M—DL2000 marker; S1—大球盖菇子实体; S2—大球盖菇菌丝体

图1 大球盖菇子实体及其菌丝体的 rDNA ITS 扩增图谱

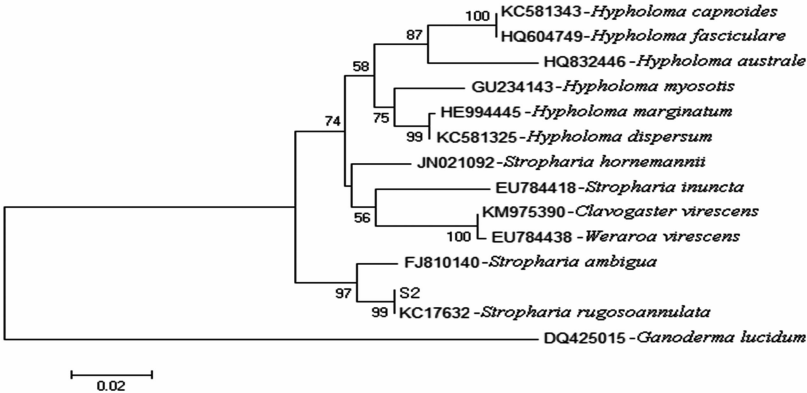


图2 大球盖菇系统发育进化树

3 结论与讨论

对于野生食用菌的人工驯化,首先须要获得纯化菌种,常见的菌种分离方法有组织分离法、孢子分离法和基内菌丝分离法,其中组织分离法因简单、易操作且纯化率高,在实践中被广泛地应用<sup>[11]</sup>。本试验采用组织分离法对野生大球盖菇进行分离,试验结果表明,野生大球盖菇能够成功分离获得母种,并且子实体经 2 h 的晾晒,既能有效降低污染率,又不影响萌发和菌丝的生长,而长时间的晾晒则会严重抑制菌丝的萌发和生长。可能是经过适宜时间的晾晒,子实体水分减少从而减少了细菌污染,再加上阳光中的紫外线具有杀菌功能,进一步降低污染,但长时间晾晒使子实体脱水,菌丝体细胞活力减弱甚至死亡,从而影响分离效果。大球盖菇最佳的分离部位是菌盖与菌柄交接处,该部位分离的菌丝生长速度快,长势旺盛且污染率低,可能的原因是该部位是子实体的生长点,菌丝体细胞活力强,分裂速度快,且该部位与空气接触少,杂菌少。在食用菌工厂化生产中,液体菌种因其生产周期短、菌龄一致、菌种生产成本低、接种简便等优点,得到了十分广泛

的应用<sup>[12]</sup>。本试验筛选出最适宜的液体培养基配方为 A2,即基础液体培养基 A1 + 蛋白胨 15 g,采用此配方培养的液体菌种,菌丝体生物量高,菌丝球密度大,形态好。原因可能是此配方所含的蛋白胨中营养更丰富,氮的形态更适合菌丝体吸收。

目前菌种鉴定、遗传多样性研究主要基于形态学、细胞、生化及分子水平开展<sup>[13]</sup>,其中 ITS 序列分析法因准确性高,简便易行而具有很大的应用价值。本试验通过对供试子实体与菌丝体的 ITS 序列进行扩增、测序、比对,验证了供试菌丝体为大球盖菇子实体的分离物,构建系统发育树后发现,分离获得的纯培养菌丝体与球盖菇属的大球盖菇(*Stropharia rugosoannulata*)系统发育关系最近,与其同源性高达 99%,确定为大球盖菇菌种。

参考文献:

[1] 黄年来. 大球盖菇的分类地位和特征特性[J]. 食用菌,1995,17(6):11.  
[2] 刘道调,刘梅香,朱慧斌,等. 冬闲田稻草生料种植大球盖菇技术[J]. 现代农业科技,2014(2):132-133.

王榆鑫,王进鑫,初江涛,等. 侧柏和国槐幼苗生长对铅胁迫的阈值[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):123-127.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.035

# 侧柏和国槐幼苗生长对铅胁迫的阈值

王榆鑫,王进鑫,初江涛,张 青,宋清玉

(西北农林科技大学资源环境学院,陕西杨凌 712100)

**摘要:**采用盆栽试验研究侧柏(*Platycladus orientalis*)、国槐(*Sophora japonica*)幼苗在适度供水(田间持水量的80%)条件下对重金属铅(Pb)的阈值反应,计算在适度供水条件下铅对叶绿素含量、生物量、株高生长量、地径生长量等的毒性阈值( $EC_x, x=10, 50$ )。结果发现,低浓度的铅对2个树种所研究指标有促进作用,而高浓度的铅则产生抑制作用。各指标中,侧柏净光合速率  $EC_{10}$  为 262 mg/kg,即对铅的反应最为敏感;国槐对铅最敏感指标为株高,株高生长量的  $EC_{10}$  为 667 mg/kg。2个树种叶绿素含量  $EC_{50}$  最大,侧柏、国槐分别为 11 352、10 050 mg/kg,说明该指标对铅抗性最强;其余指标对铅耐性大小依次为生物量 > 株高 > 地径。多指标综合分析得出的阈值,  $EC_{10, \text{国槐}}$  为 1 526.79 mg/kg,  $EC_{10, \text{侧柏}}$  为 1 731.62 mg/kg;  $EC_{50, \text{国槐}}$  为 9 104.59 mg/kg,  $EC_{50, \text{侧柏}}$  为 6 414.73 mg/kg。以上结果表明,在适度供水条件下,国槐幼苗对铅胁迫更为敏感且幼苗抗铅性也强于侧柏幼苗。

**关键词:**侧柏;国槐;铅胁迫;阈值;生理毒性

**中图分类号:**X503.235;X171.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)01-0123-05

随着矿产资源开发规模的不断扩大,由此带来的土壤重金属污染问题日趋严重,其中铅引起的污染尤为普遍。大量的铅进入陆地表层生态系统,对土壤环境造成了严重污染,使得区域环境质量下降,给生态安全造成威胁。铅是最常见的对人体和植物危害最大的重金属之一<sup>[1]</sup>,可以通过植物根、茎或叶进入植物体并在其体内积累,当达到一定数量时,就会对其生长、生理生化造成不利影响<sup>[2-4]</sup>。基于铅污染的危害性和广泛性,矿业开发后的废弃地修复是环境保护工作中急需开展的任务之一<sup>[5]</sup>。

国内外有关土壤重金属对植物的毒害效应及其阈值的研究结果表明,植物种类、生长状态、土壤性质等对土壤重金属的毒害效应及其临界值都会产生影响<sup>[6-10]</sup>。在我国常用作物产量减少10%的土壤有害物质的浓度作为毒害临界浓度<sup>[11-12]</sup>,即  $EC_{10}$ (10%有效抑制浓度)是建立基于风险的环境质量基准值的数据基础<sup>[13]</sup>;目前对镉<sup>[14]</sup>、汞<sup>[15]</sup>等污染物毒性阈值研究较多,阈值( $EC_x, x=10, 50$ )表示引起指标10%或50%抑制效应时所对应的铅浓度,关于土壤铅对作物的毒害及阈值研究已经取得了良好的进展<sup>[16]</sup>,而对西北地区常见造林树种侧柏、国槐等阈值研究目前尚未见报道。本试验研究了适度供水、不同铅浓度条件下侧柏和国槐幼苗各指标(叶绿素、株高、生物量等)的阈值大小,旨在揭示在适度供水及不同铅浓度条件下国槐、侧柏幼苗叶绿素、净光合速率、生物量、地径及株高的变化规律和2个树种耐铅性大小,为铅矿业废弃地植被恢复与土壤修复提供新的方法和技术参考。

收稿日期:2015-11-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31170579);陕西省科技统筹创新工程计划(编号:2016KTCL03-18)。

作者简介:王榆鑫(1989—),男,湖北恩施人,硕士研究生,主要从事生态环境工程研究。E-mail:sswangyuxin@163.com。

通信作者:王进鑫,教授,博士生导师,主要从事干旱区人工林生态系统恢复与生态修复理论研究。E-mail:jwang118@126.com。

[3]张 颖. 大球盖菇北方棚内反季栽培技术[J]. 中国林副特产, 2014(6):54-55.

[4]郑文彪,吕军美,潘永柱,等. 大球盖菇栽培模式比较试验[J]. 食用菌,2015,37(2):46-48.

[5]任 琪,方显出. 秕谷料栽培大球盖菇技术[J]. 食用菌,2015(4):53-53.

[6]周祖法,闫 静,王伟科. 不同培养料配方栽培大球盖菇试验[J]. 浙江农业科学,2013(2):149-150.

[7]武 旭,石建森,李 青,等. 不同配方玉米秸秆对大球盖菇原种菌丝生长的影响[J]. 山西农业科学,2013,41(9):945-946,1002.

[8]陈君琛,沈恒胜,李怡彬,等. 不同栽培基质对大球盖菇产量和品质的影响[J]. 中国食用菌,2010,29(3):18-19.

[9]陈玉华,刘君昂,周国英,等. 松乳菇 ITS 序列比较及其在乳菇属中的系统发育分析[J]. 食用菌学报,2013,20(1):18-24.

[10]Chen Y H, Yang X Y, Kun H, et al. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 60(1):107-124.

[11]任桂梅,赵海鹰,邓振山,等. 菌种分离技术及其降低污染率与死亡率实验教改初探[J]. 延安大学学报(自然科学版),2007,26(4):65-67.

[12]王 稳. 食用菌液体菌种的工艺研究及应用[D]. 镇江:江苏大学,2005:1-2.

[13]张靠稳,杨振华,马爱瑛. 标记技术在食用菌遗传多样性中的研究进展[J]. 贵州农业科学,2010,38(6):6-9.