

土生空团菌培养基优化与摇瓶培养*

薛丽宁¹ 曹凤娟¹ 赵慧英¹ 姚庆智^{1**} 闫伟²

(¹内蒙古农业大学生命科学学院 呼和浩特 010018)

(²内蒙古农业大学林学院 呼和浩特 010019)

摘要 在单因素试验的基础上,通过正交试验对CgSO1、CgSB2、CgO5和SPOP2这4株土生空团菌[*Cenococcum geophilum* Fr. (Cg)]的培养基配方分别进行了优化。结果发现,来源不同的Cg菌株对培养基组分需求存在一定差异,碳氮源、微量元素、无机盐以及维生素都不相同,CgSO1、CgSB2、CgO5对葡萄糖和麦芽汁的混合C源以及牛肉浸膏利用最好,SPOP2对麦芽汁以及酒石酸铵的利用最好,适量的微量元素、无机盐以及维生素B1会促进Cg的生长。经平板培养基优化后的培养基配方可应用到液体培养中,这4株Cg菌经液体培养后菌丝产量分别达到了13.2、12.4、18.9和15.1g/L,均可满足液体发酵的生产要求。图1 表6 参17

关键词 土生空团菌; 正交试验; 培养基; 优化; 液体发酵

CLC Q93-335

Medium Optimization and Submerged Culture for *Cenococcum geophilum* Fr.*

XUE Lining¹, CAO Fengjuan¹, ZHAO Huiying¹, YAO Qingzhi^{1**} & YAN Wei²

(¹College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

(²College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China)

Abstract Based on the results of the single-factor tests, the medium components of four strains of Cg (CgSO1, CgSB2, CgO5 and SPOP2) were optimized by the orthogonal tests. The results showed that the four strains of Cg required different medium components and different carbon sources, nitrogen sources, microelements, mineral salt components and vitamins. The best carbon source and nitrogen source for CgSO1, CgSB2 and CgO5 were glucose + wort and beef extract while SPOP2 were wort and ammonium tartrate. The appropriate amount of microelements, mineral salts and Vitamin B1 enhanced the growth of CgSO1, CgSB2, CgO5 and SPOP2. The results of the optimized medium by plate culture could be used in liquid culture and the biomass of the four strains in liquid culture were 13.2, 12.4, 18.9 and 15.1 g/L, respectively, which all met the requirement of liquid fermentation production. Fig 1, Tab 6, Ref 17

Keywords *Cenococcum geophilum* Fr.; orthogonal test; culture medium; optimization; liquid fermentation

CLC Q93-335

土生空团菌(*Cenococcum geophilum* Fr. Cg)属于囊菌亚门(Ascomycotina)大团囊菌科(Elaphomycetaceae)空团菌属(*Cenococcum*),主要以菌丝体和菌核结构存在,菌丝黑色,极少形成有性结构^[1]。Cg是自然界最为常见的外生菌根真菌之一,它的寄主范围非常广泛,几乎与所有已知的外生菌根植物形成菌根,还能与许多内生菌根植物和草本植物形成菌根^[2-4]。Cg具有突出的抗旱性和抗贫瘠能力,在含水量低的土壤及中各种恶劣生境条件下常成为优势种群^[5-6]。据报道,该

属在全球各地都有分布,我国也有着丰富的Cg资源,不仅在植被恢复中发挥着巨大作用,也是内蒙古地区具有开发应用潜力的菌物资源^[7]。

目前,国内外对Cg的研究较多,涉及到形态特征、培养特性、分布特征、遗传结构、对植物生长影响及对重金属耐受能力等多个方面^[7-14]。其中,一些学者对不同Cg菌株的生长速度、最佳生长温度、pH适应范围及耐旱能力进行了研究,发现从不同地理生境采集到的菌株,其菌丝生长的最佳温度条件差异极大,而且有较宽的pH值适应范围^[7, 10]。此外,另有一些研究也发现了Cg存在较高的遗传多样性^[7],这与Cg不同菌株培养特性的巨大差异有必然联系。正是由于Cg的生长受到诸多因素(温度、酸度、营养物质等)的影响,而且不同菌株培养特性差异大,到目前为止,Cg菌株的实验室扩繁条件仍有待进一步研究^[10]。

收稿日期 Received: 2012-01-09 接受日期 Accepted: 2012-03-09

*国家自然科学基金项目(31060111)和内蒙古教育厅基金项目(NJ09055)资助 Supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 31060111) and the Foundation of Education Department of Inner Mongolia, China (No. NJ09055)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: yaoqingzhi@163.com)

因此,深入研究Cg的营养生理特性,对于筛选、快速培育优良菌株以及推进菌根生物应用技术具有重要的科学意义.前期通过单因素试验研究培养基不同组分对4株Cg生长的影响,发现C源(葡萄糖+麦芽汁)对CgSO1、CgSB2和CgO5的生长影响较大,C源(麦芽汁)对SPOP2的生长影响较大;N源(牛肉浸膏)对CgSO1、CgSB2和CgO5的生长影响较大,N源(酒石酸铵)对SPOP2的生长影响较大;微量元素对4株Cg的生长均有影响;无机盐(柠檬酸铁)对CgSO1以及SPOP2的生长影响较大,无机盐(MgSO₄)对CgSB2的生长影响较大;维生素B1对CgO5的生长影响较大.鉴于此,本研究在单因素试验基础上,采用正交试验对这4株Cg的培养基配方进行优化,并对正交试验结果进行验证,以期确定适合这4株Cg的最佳培养基组分,为Cg的大量扩繁提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

CgSO1分离于虎榛子(*Ostryopsis davidiana*)根围土中的土生空团菌菌核;CgO5分离于虎榛子菌根组织;CgSB2分离于白桦(*Betula Platyphylla*)根围土中的土生空团菌菌核;SPOP2分离于山杨(*Populus davidiana*)根围土中的土生空团菌菌核.

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 取出在4℃冰箱中保存的菌种,室温下缓菌1 d,挑取边缘菌丝转接于Pachlewski(简称Pach)培养基^[15]进行平板培养,长出菌丝后再连续转接2次,25℃暗培养25 d备用.

1.2.2 固体平板培养 配制Pach固体培养基,灭菌后制作平

板培养基,用无菌打孔器在培养25 d的菌种菌落边缘打取菌丝块进行接种,放于25℃培养箱中暗培养30 d^[16].

1.2.3 液体摇瓶培养 选择培养25 d活化后的固体菌种,超净工作台内将固体菌种切成小块接入Pach液体培养基^[15]中,置于摇床上培养,待菌丝长至旺盛时用组织分散机粉碎后再次转接入Pach液体培养基中,装液量为100 mL(500 mL三角瓶),接菌量为10%(w/V),摇床转速为100 r/min,培养温度为25℃.

各试验培养基灭菌前初始pH值用1 mol/L HCl或1 mol/L NaOH调至所需pH值,121℃灭菌30 min.

1.2.4 正交试验设计 在单因素试验结果的基础上,以4株Cg的单菌落菌丝生物量为依据,采用四因素三水平L₉(3⁴)正交试验设计,对其培养基组分进行优化,每个处理3个重复.4株Cg的正交试验设计如表1所示.

1.2.5 验证试验 菌剂生产常用液体发酵法,因此从固体平板培养和液体摇瓶培养两个方面对正交试验得到的培养基最佳水平组合进行验证.按照上述正交试验得出的适合各菌株的最佳培养基组合,分别配制固体和液体培养基,分别接入4菌株.固体培养30 d后测定单菌落菌丝生物量.液体培养每2 d测定一次菌丝生物量,培养30 d,每种Cg均培养45瓶.

1.2.6 测量和分析方法 采用干重法测定菌丝生物量^[17].在固体平板培养中,将真菌单菌落从培养基中取出,在沸水中将残留的培养基溶化、洗去,蒸馏水冲洗数次后;在80℃恒温条件下烘干至恒重;液体摇瓶培养中,用滤纸过滤发酵液,将滤出的菌丝用蒸馏水冲洗数次后,在80℃恒温条件下烘干至恒重.

表1 4株土生空团菌(Cg)正交试验因素及水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal tests of the four Cg strains

CgSO1	水平/因素 Level/factor	A: 葡萄糖+麦芽汁浓度 Glucose (m/g) + wort (φ/mL L ⁻¹)	B: 牛肉浸膏浓度 Beef extract (ρ/g L ⁻¹)	C: 微量元素浓度 Trace elements (φ/mL L ⁻¹)	D: 柠檬酸铁浓度 Ferric citrate (φ/mL L ⁻¹)
	1	19.6+49	3.77	0.6	3
	2	22.7+53	4.35	0.8	6
	3	25.2+63	4.84	1.0	9
CgSB2	水平/因素 Level/factor	A: 葡萄糖+麦芽汁浓度 Glucose (m/g) + wort (φ/mL L ⁻¹)	B: 牛肉浸膏浓度 Beef extract (ρ/g L ⁻¹)	C: MgSO ₄ (ρ/g L ⁻¹)	D: 微量元素浓度 Trace elements (φ/mL L ⁻¹)
	1	19+15	2.17	0.6	0.5
	2	25+20	2.88	0.8	1.0
	3	31+25	3.60	1.0	1.5
CgO5	水平/因素 Level/factor	A: 葡萄糖+麦芽汁浓度 Glucose (m/g) + wort (φ/mL L ⁻¹)	B: 牛肉浸膏浓度 Beef extract (ρ/g L ⁻¹)	C: 微量元素浓度 Trace elements (φ/mL L ⁻¹)	D: 维生素B1浓度 Vitamin B1 (φ/mL L ⁻¹)
	1	17.0+40	6.52	1.0	1
	2	22.7+53	8.70	1.5	5
	3	27.5+67	10.87	2.0	10
SPOP2	水平/因素 Level/factor	A: 麦芽汁浓度 Wort (φ/mL L ⁻¹)	B: 酒石酸铵浓度 Ammonium tartrate (ρ/g L ⁻¹)	C: 微量元素浓度 Trace elements (φ/mL L ⁻¹)	D: 柠檬酸铁浓度 Ferric citrate (φ/mL L ⁻¹)
	1	250	1.4	1	1
	2	330	1.8	2	3
	3	410	2.3	3	6

2 结果及分析

2.1 各因素对土生空团菌生长速率的影响顺序和优化水平组合

以Cg菌丝体干生物量为评价指标进行极差分析,从分析结果可以看出各因素对菌丝干生物量影响由大到小的顺序和培养基最佳水平组合。

由表2的试验结果分析中可以看出,影响CgSO1生长因素的主次顺序为B>A>D>C, CgSO1的最佳培养基组合为A₂B₂C₂D₂,即每L培养基营养成分含量为:葡萄糖22.7 g,麦芽汁53 mL,牛肉浸膏4.35 g, 1%的柠檬酸铁6 mL,微量元素0.8 mL。

由表3的试验结果分析中可以看出,影响CgSB2生长

表2 CgSO1正交试验结果及分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal test of CgSO1

试验号 Experiment No.	因素 Factor				生物量 Biomass
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.0567
2	1	2	2	2	0.0622
3	1	3	3	3	0.0544
4	2	1	2	3	0.0622
5	2	2	3	1	0.0631
6	2	3	1	2	0.0619
7	3	1	3	2	0.0566
8	3	2	1	3	0.0571
9	3	3	2	1	0.0555
K ₁	0.1723	0.1765	0.1757	0.1753	
K ₂	0.1882	0.1824	0.1799	0.1807	
K ₃	0.1692	0.1708	0.1741	0.1737	
k ₁	0.0574	0.0588	0.0587	0.0584	
k ₂	0.0627	0.0608	0.0599	0.0602	
k ₃	0.0564	0.0536	0.0580	0.0579	
极差 R	0.0063	0.0072	0.0019	0.0023	
主次顺序 Primary and secondary order					
最优组合 Optimum combination					
B>A>D>C					
A ₂ B ₂ C ₂ D ₂					

表3 CgSB2正交试验结果及分析

Table 3 Results and analysis of orthogonal test of CgSB2

试验号 Experiment No.	因素 Factor				生物量 Biomass
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.0685
2	1	2	2	2	0.0802
3	1	3	3	3	0.0775
4	2	1	2	3	0.0747
5	2	2	3	1	0.0821
6	2	3	1	2	0.0803
7	3	1	3	2	0.0851
8	3	2	1	3	0.0833
9	3	3	2	1	0.0812
K ₁	0.2262	0.2283	0.2321	0.2329	
K ₂	0.2371	0.2456	0.2361	0.2456	
K ₃	0.2506	0.2400	0.2457	0.2355	
k ₁	0.0754	0.0761	0.0774	0.0776	
k ₂	0.0790	0.0819	0.0787	0.0819	
k ₃	0.0835	0.0800	0.0819	0.0785	
极差 R	0.0081	0.0058	0.0045	0.0043	
主次顺序 Primary and secondary order					
最优组合 Optimum combination					
A>B>C>D					
A ₃ B ₂ C ₃ D ₂					

因素的主次顺序为A>B>C>D, CgSB2的最佳培养基组合为A₃B₂C₃D₂,即每L培养基营养成分含量为:葡萄糖31 g,麦芽汁25 mL,牛肉浸膏2.88 g, MgSO₄ 1 g, 微量元素1 mL。

由表4的试验结果分析中可以看出,影响CgO5生长因素的主次顺序为A>B>C>D, CgO5的最佳培养基组合为A₃B₂C₂D₂,即每L培养基营养成分含量为:葡萄糖27.5 g,麦芽汁67 mL,牛肉浸膏8.7 g, 微量元素2 mL, VB₁ 5 mL。

由表5的试验结果分析中可以看出,影响SPOP2生长

表4 CgO5正交试验结果及分析

Table 4 Results and analysis of orthogonal test of CgO5

试验号 Experiment No.	因素 Factor				生物量 Biomass
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.0907
2	1	2	2	2	0.0959
3	1	3	3	3	0.0853
4	2	1	2	3	0.0949
5	2	2	3	1	0.0955
6	2	3	1	2	0.0905
7	3	1	3	2	0.0986
8	3	2	1	3	0.0979
9	3	3	2	1	0.0963
K ₁	0.2719	0.2841	0.2791	0.2825	
K ₂	0.2801	0.2893	0.2871	0.2849	
K ₃	0.2927	0.2721	0.2793	0.2781	
k ₁	0.0906	0.0947	0.0930	0.0942	
k ₂	0.0934	0.0964	0.0957	0.0950	
k ₃	0.0976	0.0907	0.0931	0.0927	
极差 R	0.0070	0.0057	0.0027	0.0023	
主次顺序 Primary and secondary order					
最优组合 Optimum combination					
A>B>C>D					
A ₃ B ₂ C ₂ D ₂					

表5 SPOP2正交试验结果及分析

Table 5 Results and analysis of orthogonal test of SPOP2

试验号 Experiment No.	因素 Factor				生物量 Biomass
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.0461
2	1	2	2	2	0.0534
3	1	3	3	3	0.0539
4	2	1	2	3	0.0566
5	2	2	3	1	0.0553
6	2	3	1	2	0.0558
7	3	1	3	2	0.0653
8	3	2	1	3	0.0634
9	3	3	2	1	0.0625
K ₁	0.1533	0.1679	0.1652	0.1638	
K ₂	0.1777	0.1721	0.1725	0.1745	
K ₃	0.1912	0.1722	0.1745	0.1739	
k ₁	0.0511	0.0559	0.0551	0.0546	
k ₂	0.0592	0.0574	0.0575	0.0582	
k ₃	0.0637	0.0574	0.0582	0.0580	
极差 R	0.0126	0.0015	0.0031	0.0036	
主次顺序 Primary and secondary order					
最优组合 Optimum combination					
A>D>C>B					
A ₃ B ₃ C ₃ D ₂					

因素的主次顺序为A>D>C>B, SPOP2的最佳培养基组合为A₃B₃C₃D₂, 即每L培养基营养成分含量为: 麦芽汁410 mL, 酒石酸铵2.3 g, 微量元素3 mL, 柠檬酸铁3 mL。

2.2 土生空团菌在最优水平组合培养基中生长情况

验证试验结果(表6)表明, 培养基经正交试验优化后, 4株菌株的菌丝产量均有很大提高。其中在固体平板验证试验中, 培养30 d后CgSO1、CgSB2、CgO5和SPOP2单菌落菌丝生物量分别达到了0.064 3、0.085 3、0.098 5和0.065 9 g; 在液体摇瓶验证试验中, CgSO1、CgSB2、CgO5和SPOP2菌丝产量趋于稳定的培养时间分别为14、20、16和14 d, 分别达到了13.2、12.4、18.9和15.1 g/L(图1)。

表6 四菌株在最优水平组合培养基中生长的菌丝生物量
Table 6 Mycelial biomass of the four Cg strains in the optimal culture medium

菌株 Strain	试验条件 Test condition	单菌落生物量 Biomass of single colony (m/g)	液体摇瓶生物量 Biomass of liquid shake flask (g/L)
CgSO1	A ₂ B ₂ C ₂ D ₂	0.064 3	13.2
CgSB2	A ₃ B ₃ C ₃ D ₂	0.085 3	12.4
CgO5	A ₃ B ₃ C ₃ D ₂	0.098 9	18.9
SPOP2	A ₃ B ₃ C ₃ D ₂	0.065 9	15.1

3 结论与讨论

Cg分布地域以及对生境适应性极其广泛, 而且宿主包含了几乎所有能够形成外生菌根的植物, 因此, 不同Cg对营养需求也不尽相同。本研究结果表明, 不同来源的4株Cg菌株在营养生理及培养基组分上存在一定差异。4个菌株的最适碳源、氮源、微量元素、无机盐以及维生素等因子的种类及浓度不尽相同。C源物质是组成培养基的主要成分之一。微生物细胞含碳量约占干重的50%, 因此, 除水分外, C源是需要

量最大的营养物质。C源为细胞提供能源, 组成菌体细胞成分的碳架, 是微生物生命活动能量的来源, 也是微生物各种生命活动的物质基础。本试验中Cg对混合C源(葡萄糖+麦芽汁)和麦芽汁有较好的利用, 但对单一的C源如葡萄糖、蔗糖利用较差。其中Cg菌丝在有麦芽汁存在的情况下生长较好, 说明Cg不仅能很好地分解利用其中的碳水化合物, 而且这些物质中的维生素、生物素以及金属离子等微生物必需的生长因子也是Cg生长过程中不可缺少的。N源是构成重要生命物质蛋白质和核酸等的主要元素, N占微生物细胞干重的12%-15%, 因此, 它与C源同样是微生物的主要营养物。本试验中供试的4株Cg菌株在所选N源中对牛肉浸膏和酒石酸铵的利用最好。无机盐是微生物生长所不可缺少的营养物质, 其主要功能是: 构成细胞的组成成分; 参与酶的组成; 作为酶的激活剂; 调节细胞渗透压, pH值和氧化还原电位; 作为某些自氧微生物的能量和无氧呼吸时的氢受体。不同种微生物所需的无机元素浓度有时差别很大。微量元素往往参与酶蛋白的组成或者作为酶的激活剂, 如铜是多酚氧化酶和抗坏血酸氧化酶的成分, 锌是乙醇脱氢酶和乳酸脱氢酶的活性基, 钴参与维生素B₁₂的组成, 钼参与硝酸还原酶和固氮酶的组成, 锰是多种酶的激活剂, 有时可以代替Mg²⁺起激活剂作用。

宝秋利等通过测量固体培养基中菌落直径对Cg菌丝体纯培养条件进行了初步研究^[10], 而菌剂生产常用液体发酵法, 故本研究通过固体平板试验确定了4株Cg的最佳培养基组分, 并采用液体摇瓶试验对其结果进行了验证。验证试验结果表明, 固体平板试验优化得出的最佳培养基组合同样适用于液体培养。固体平板培养方便快捷, 占空间小, 成本低, 效率高, 与液体培养相比有较大优势, 因此, 用固体培养代

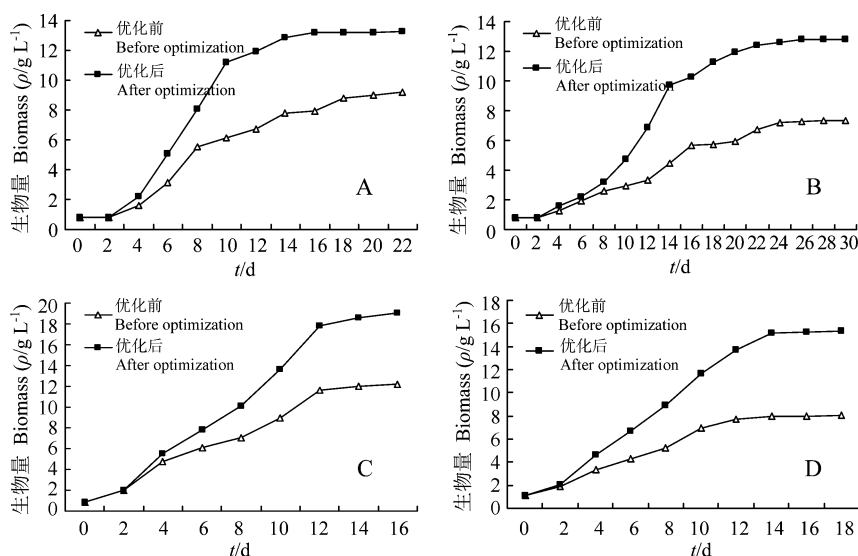


图1 验证试验中CgSO1 (A)、CgSB2 (B)、CgO5 (C) 和SPOP2 (D) 的生长曲线
Fig. 1 The growth curves of CgSO1 (A), CgSB2 (B), CgO5 (C) and SPOP2 (D) in the confirmatory test

替液体培养对培养基进行优化是一种合理可行的途径。

在优化后的液体培养基中, 4株Cg的菌丝产量均达到了12.0 g/L以上, 而李敏等对外生菌根真菌褐环乳牛肝菌(*Suillus luteus*)发酵的营养条件进行优化后, 最终菌体量达12.0 g/L^[15], 故本试验优化后培养基也已达到了菌丝液体发酵生产的要求, 从而解决Cg大量扩繁这一难题, 突破Cg应用技术的瓶颈, 为菌剂的制作提供实验依据, 并为Cg在内蒙古山地菌根化育苗及造林技术的应用提供重要的理论依据。优化后4个菌株产量较优化前有了显著的提高, 但本研究是在实验室平板和摇瓶条件下进行, 要实现产业化开发, 还需进行发酵罐条件下的放大试验及相关剂型的开发研究, 目前有关工作正在进行中。

参考文献 [References]

- Matsuda Y, Hayakawa N, Ito S. Local and microscale distributions of *Cenococcum geophilum* in soils of coastal pine forests. *Fungal Ecol*, 2009, **2** (1): 31-35
- Allen ME. The Ecology of Mycorrhizae. New York: Cambridge University Press, 1991. 113-118
- Vohnik M, Fendrych M, Albrechtova J. Intracellular colonization of *rhododendron* and *Vaccinium* roots by *Cenococcum geophilum*, *Geomyces pannorum* and *Meliniomyces variabilis*. *Folia Microbiol*, 2007, **54** (4): 407-414
- He XH, Duan YH, Chen YL, Xu MG. A 60-year journey of mycorrhizal research in China: past, present and future directions. *Sci China Life Sci*, 2010, **53** (12): 1374-1398
- Buscardo E, Rodriguez-Echeverria S, Martin MP. Impact of wildfire return interval on the ectomycorrhizal resistant propagules communities of a Mediterranean open forest. *Fungal Biol*, 2010, **114** (8): 628-636
- Goncalves SC, Martins-Loucao MA, Freitas H. Evidence of adaptive tolerance to nickel in isolates of *Cenococcum geophilum* from serpentine soils. *Mycorrhiza*, 2009, **19** (4): 221-230
- 陈立红, 闫伟, 徐燕. 土生空团菌(*Cenococcum geophilum* Fr.)的菌种鉴定及其遗传多样性的初步分析[J]. 中国农业科学, 2007, **40** (10): 2214-2220 [Chen LH, Yan W, Xu Y. Identification and preliminary analysis of genetic diversity of *Cenococcum geophilum* Fr [J]. *Sci Agric Sin*, 2007, **40** (10): 2214-2220]
- Mohammad B, Sergei P, Urmas K, Leho T. A single European aspen (*Populus tremula*) tree individual may potentially harbour dozens of *Cenococcum geophilum* ITS genotypes and hundreds of species of ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011, **75** (2): 313-320
- Gavin K, Glenn P. Host associations between fungal root endophytes and boreal trees. *Microb Ecol*, 2011, **62** (2): 460-473
- 宝秋利, 闫伟, 梁显丽. 土生空团菌(*Cenococcum geophilum* Fr.)菌丝体纯培养条件的初步研究[J]. 内蒙古农业大学学报, 2005, **16** (1): 34-36 [Bao QL, Yan W, Liang XL. A preliminary study on the mycelial pure culture conditions of *Cenococcum geophilum* Fr. [J]. *J Inner Mongolia Agric Univ*, 2005, **16** (1): 34-36]
- Maria R, Tomasz L, Małgorzata S. Species and functional diversity of ectomycorrhizal fungal communities on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees on three different sites. *Ann For Sci*, 2011, **68**: 5-15
- 樊永军, 闫伟, 王黎元. 贺兰山地区青海云杉外生菌根的形态类型及分子鉴定[J]. 林业科学, 2011, **47** (6): 108-113 [Fan YJ, Yan W, Wang LY. Morphological type and molecular identification of ectomycorrhizae on *Picea crassifolia* in Helan Mountain [J]. *Sci Silv Sin*, 2011, **47** (6): 108-113]
- Douhan GW, Hurn KL, Douhan LI. Significant diversity and potential problems associated with inferring population structure within the *Cenococcum geophilum* species complex. *Mycologia*, 2007, **99** (6): 812-819
- Kipfer T, Egli S, Ghazoul J, Moser B, Wohlgemuth T. Susceptibility of ectomycorrhizal fungi to soil heating. *Fungal Biol*, 2010, **114** (5/6): 467-472
- 李敏, 闫伟, 堵国成, 陈坚, 刘立明. 褐环乳牛肝菌发酵条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2009, **28** (3): 390-396 [Li M, Yan W, Du GC, Chen J, Liu LM. Optimization of fermentation conditions by *Suillus luteus* [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2009, **28** (3): 390-396]
- 曹凤娟, 姚庆智, 闫伟. 萝卜对土生空团菌菌丝生长的影响[J]. 微生物学通报, 2011, **38** (7): 1000-1006 [Cao FJ, Yao QZ, Yan W. Influence of *Raphanus sativus* L. on the mycelium growth of *Cenococcum geophilum* Fr. [J]. *Microbiology*, 2011, **38** (7): 1000-1006]
- 贺元川, 蒲嵩, 何开泽, 谭健, 李静, 赵宗杰. 均匀设计法优化樟芝产三萜液体发酵条件[J]. 应用与环境生物学报, 2011, **17** (6): 901-906 [He YC, Pu Q, He KZ, Tan J, Li J, Zhao ZJ. Optimization of liquid fermentation conditions of *Antrodia cinnamomea* producing triterpenoid by uniform design [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2011, **17** (6): 901-906]