



陈美元

博士，教授级高级工程师。现任福建省农业科学院食用菌研究所副所长、国家食用菌产业技术体系双孢蘑菇品种改良岗位科学家、中国菌物学会食用真菌专业委员会副主任委员等职。从事双孢蘑菇育种新技术的建立与多元化新品种的选育及推广 20 多年，发表第一或通讯作者研究论文 30 多篇，主持获得 5 项双孢蘑菇新品种权，主持选育 2 个、参加选育 6 个国家或省级认定双孢蘑菇新品种，参加获得国家科技进步二等奖 1 项、省部级二等奖 3 项。

双孢蘑菇萎锈灵抗性基因定点突变的载体构建与遗传转化

卢园萍¹ 肖婷婷² 尚俊军² 曾志恒¹ 陈美元¹ 鲍大鹏²

①福建省农业科学院食用菌研究所 福建 福州 350012

②上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201403

摘要：为建立更为安全、有效的双孢蘑菇遗传转化体系，构建了双孢蘑菇琥珀酸脱氢酶的铁硫蛋白亚基 *Agstd1* 突变（His 突变为 Leu）表达载体 *pAgstd1*，并通过农杆菌介导方法转化双孢蘑菇 W192，经萎锈灵筛选以及 PCR 扩增和 *Mnl* I 酶切验证后获得了转化菌株。验证结果表明，点突变的铁硫蛋白亚基 *Agstd1* 可以作为双孢蘑菇有效的抗性标记基因。因其并未引入新的外源基因，是一种比潮霉素抗性基因更为安全的筛选标记，将可用于双孢蘑菇等食用菌的遗传转化。

关键词：食用菌，遗传转化，抗性标记，萎锈灵

[引用本文] 卢园萍, 肖婷婷, 尚俊军, 曾志恒, 陈美元, 鲍大鹏, 2021. 双孢蘑菇萎锈灵抗性基因定点突变的载体构建与遗传转化. 菌物学报, 40(12): 3256-3264

Lu YP, Xiao TT, Shang JJ, Zeng ZH, Chen MY, Bao DP, 2021. Construction of a vector containing a point-mutated carboxin-resistance gene and genetic transformation of *Agaricus bisporus*. Mycosystema, 40(12): 3256-3264

基金项目：福建省自然科学基金（2019J05143）；福建省农业科学院科研项目（AGP2018-10）；国家现代农业产业技术体系专项资金（CARS-20）；“5511”协同创新工程（XTCXGC2021007）

Supported by Natural Science Foundation of Fujian Province (2019J05143), Scientific Research Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (AGP2018-10), China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-20), and “5511” Collaborative Innovation Project (XTCXGC2021007).

✉ Corresponding authors. E-mail: cmly1972@gmail.com, Baodp@hotmail.com

● Co-first author.

Received: 2021-08-21, accepted: 2021-10-09

Construction of a vector containing a point-mutated carboxin-resistance gene and genetic transformation of *Agaricus bisporus*

LU Yuan-Ping¹ XIAO Ting-Ting² SHANG Jun-Jun² ZENG Zhi-Heng¹ CHEN Mei-Yuan¹
BAO Da-Peng²

① Institute of Edible Fungi, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350012, China

② Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China

Abstract: In order to establish a safe and efficient genetic transformation system for *Agaricus bisporus*, an expressed vector with mutant *Agdsi1* (a single amino-acid substitution, His to Leu) encoding iron-sulphur protein of succinate dehydrogenase was constructed. After transformation of *A. bisporus* strain W192 by *Agrobacterium*-mediated method, putative transformants were selected by carboxin and identified by PCR amplification and digestion with *Mnl* I restriction enzyme. The result showed that a point-mutated *Agdsi1* can serve as an effective resistance marker for *A. bisporus*. Without introducing exogenous gene, point-mutated *Agdsi1* gene is a safer selective marker than hygromycin resistance gene, and can be used for genetic transformation of edible mushroom such as *A. bisporus*.

Key words: edible mushroom, genetic transformation, resistant marker, carboxin

双孢蘑菇是世界上广泛栽培的、重要的食用真菌。近年来，双孢蘑菇基因组 (Morin *et al.* 2012)、转录组 (吴小梅等 2017; 施肖堃等 2018) 和蛋白质组 (Chen *et al.* 2017) 测序完成，为挖掘双孢蘑菇重要功能基因，以及研究双孢蘑菇子实体形成和发育机理奠定了基础。目前，双孢蘑菇遗传转化中使用的选择标记多为潮霉素抗性基因——潮霉素磷酸转移酶基因 (Chen *et al.* 2000; Eastwood *et al.* 2008; 蔡志欣等 2013; Heneghan *et al.* 2016; Pelkmans *et al.* 2016)。潮霉素 B (hygromycin B) 是一种氨基糖苷类抗生素，可以抑制原核和真核生物蛋白质合成，从而导致其生长受到抑制 (Gonzalez *et al.* 1978; Gritz & Davies 1983; Malpartida *et al.* 1983)。潮霉素磷酸转移酶基因表达产物——潮霉素磷酸转移酶

(hygromycin B phosphotransferase, HPH) 可通过磷酸化作用使潮霉素 B 失去活性，进而机体产生抗性 (Gritz & Davies 1983; Malpartida *et al.* 1983; Mach *et al.* 1994)。但潮霉素抗性标记的安全性一直备受消费者的关注，并且在许多国家潮霉素抗性基因的使用也受到限制 (Shang *et al.* 2018)。因此，挖掘安全、有效的新抗性筛选标记在双孢蘑菇等食用菌遗传转化中具有重要意义。

本研究以糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* 琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白亚基 *sdi1* 氨基酸序列为参考，采用本地 Blast 进行比对分析在双孢蘑菇基因组中获得 *sdi1* 的同源蛋白 *Agdsi1*；并将点突变的 *Agdsi1* 作为抗性选择标记转入到双孢蘑菇中，建立了一套利用萎锈灵筛选转化子的双孢蘑菇遗传转化体系。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

双孢蘑菇 W192 菌株由福建省农业科学院食用菌研究所提供，大肠杆菌受态细胞 TOP10 和农杆菌 AGL1 感受态细胞均购自唯地生物技术有限公司(上海)。质粒 pCAMBIA 1300 由上海市农业科学院食用菌研究所提供。

1.2 双孢蘑菇琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白亚基 Agsdi1 分析

以糙皮侧耳的 *sdi1* (Honda *et al.* 2000) 氨基酸序列为参考，采用 tBlastn 与双孢蘑菇 As2796 菌株的基因组(福建省农业科学院食用菌研究所提供)进行比对，获得双孢蘑菇 As2796 基因组中 *sdi1* 的同源基因。将获得的双孢蘑菇 *sdi1* 序列提交到双孢蘑菇 H97 基因组网站中进行比对分析 (https://genome.jgi.doe.gov/Agabi_varbisH97_2/Agabi_varbisH97_2.home.html)。以双孢蘑菇 As2796 的 *sdi1* 序列及双孢蘑菇 H97 的 CDS 序列为参考序列设计引物 AgsdiF/AgsdiR(表 1)，双孢蘑菇 W192 的 DNA 样品为模板克隆 *sdi1* 同源系列，并将

其命名为 *Agsdi1*；以 cDNA 为模板克隆 *Agsdi1* 的开放阅读框 ORF 片段，并将扩增获得的片段进行测序。

1.3 Agsdi1 基因突变表达载体的构建

以双孢蘑菇 As2796 的基因组参考序列，我们分别提取了 *sdi1* 上游~1 500bp 和下游~1 000bp 的序列，并设计引物对 Psdi_SdiF1/SdiR1 和 SdiF2/SdiR2_Ter(表 1，图 1)。为获得 *Agsdi1* 突变位点，我们将 *Agsdi1* 分成两个片段进行扩增，且将组氨酸 His 的密码子 CAC 突变为亮氨酸 Leu 的密码子 CTC(图 1A)。

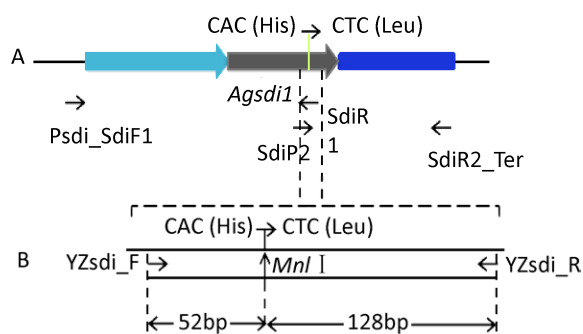


图 1 双孢蘑菇 *Agsdi1* 突变基因和引物设计策略
Fig. 1 Mutant *Agaricus bisporus* *Agsdi1* gene and design strategies for primers.

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Primer used for PCR amplification

引物名称	序列
Primer	Sequence (5'-3')
Psdi_SdiF1	ACTGAATTAACGCCGAATTAATGAACAATACAA TTCATGTCAAC
SdiR1	AGTTGAAGATGGTGAGGCATCGG
SdiF2	ATGAAATGAGCTTGATCCGATGCCTCACCATCTT CAACT
SdiR2_Ter	GAGTGAGCTAACTCACATTAATCATAGGTGTCAA CGAAGGATAC
AgsdiF	CAACACATACAACATGCTCTCCG
AgsdiR	GGCTAGTCAGTGGCAAGCT
YZsdi_F	TGGTGCTCAACGCAAAGTGG
YZsdi_R	GCTTGATCTTGCGCATGGCA

以二元表达载体 pCAMBIA 1300 为骨架，采用限制性内切酶 *Ase* I (TaKaRa) 将其酶切成线性载体，然后将扩增获得的两个片段(大小分别~2 500bp 和~1 200bp) 连入线性载体中，进而构建含突变位点的 *Agsdi1* 表达载体，我们将其命名为 pAgsdi1(图 2)。

1.4 双孢蘑菇转化及筛选

参照农杆菌介导双孢蘑菇转化方法(Chen *et al.* 2000; 陈美元等 2009)，将与农杆菌共培养 4d (21℃) 的双孢蘑菇菌褶转移到含萎锈灵 Carboxin (15μg/mL) 和头孢噻肟 (200μg/mL) 的初筛培养基 MMP [10mmol/L 3-(N-吗啡啉) 丙磺酸, 0.5%蛋白胨和 1%麦芽提取物, pH 调至 7.0] 平板上，24℃培养 30d；将新长出的

菌丝块转接到含萎锈灵 Carboxin (15 μ g/mL) 和头孢噻肟 (200 μ g/mL) 的 PDA 培养基 24 $^{\circ}$ C 培养 30d, 进行复筛。

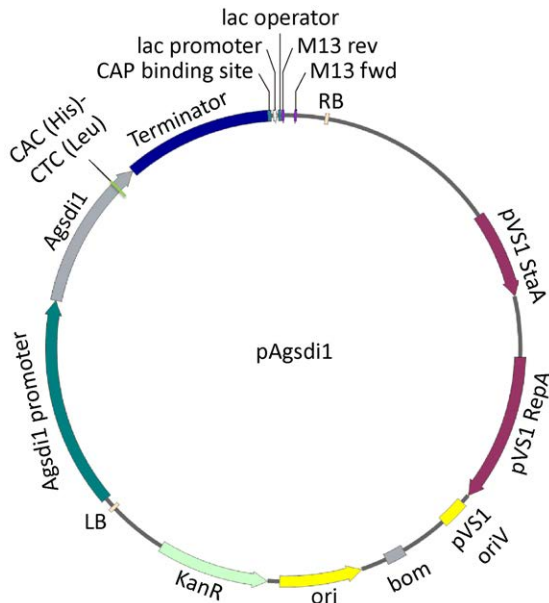


图 2 pAgdsi1 质粒图谱

Fig. 2 Structure of the plasmid pAgdsi1.

1.5 双孢蘑菇拟转化子的验证

为验证转化子菌株, 首先我们采用了真菌 DNA 提取试剂盒 SP Fungal DNA kit (Omega Bio-Tek, 美国) 对复筛后获得的拟转化子菌株进行 DNA 提取; 然后以拟转化子菌株的 DNA 为模板进行 PCR 扩增; PCR 反应体系: PCR Mix 12.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, 引物 YZsdi_F 和 YZsdi_R 各 1 μ L, 无菌水 9.5 μ L, 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 热变性 4min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 30 个循环。引物 YZsdi_F 和 YZsdi_R 的序列及设计见表 1 和图 1B。

然后将扩增后得到的 PCR 产物采用限制性内切酶 *Mnl* I [NEB (北京) 有限公司] 进行酶切进一步验证转化子菌株, 酶切反应体系: 2 μ L 10 \times CutSmart Buffer, 0.5 μ L *Mnl* I 内切酶, PCR 扩增产物 12 μ L, 无菌水 5.5 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切过夜, 酶切完成后将酶切产物利用 3% 的琼脂糖凝胶进行电泳。

1.6 双孢蘑菇转化子菌株传代培养

为检测双孢蘑菇转化子菌株能否稳定遗传, 我们选取了 8 个转化子菌株接种于 PDA 培养基中, 传代 5 代后, 将转化子菌株接种于含 15 μ g/mL 萎锈灵的 PDA 培养基中, 24 $^{\circ}$ C 培养 30d 观察菌丝生长情况。同时提取 DNA 并进行 PCR 扩增和酶切验证, PCR 扩增及酶切验证参照 1.5 中 PCR 扩增和酶切的反应体系及反应程序。

2 结果与分析

2.1 双孢蘑菇琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白亚基 Agdsi1 分析

以糙皮侧耳的 *sdi1* 氨基酸序列为参考, 采用 tBlastn 与双孢蘑菇 As2796 菌株的基因组进行比对发现双孢蘑菇 As2796 基因组中含有一条 *sdi1* 同源蛋白编码序列 (E value=5e-051)。

以 cDNA 为模板克隆到~800bp 的片段进行测序, 并应用 DNAMAN 将 *Agdsi1* 序列与其 CDS 序列进行比对分析, 结果显示 *Agdsi1* 从起始密码 ATG 到终止密码 TAG 有 5 个内含子和 6 个外显子。采用 ORF Finder 将其 ORF 片段翻译成氨基酸序列后, 将其蛋白序列与灰盖鬼伞 *Coprinus cinerea*、香菇 *Lentinula edodes* 以及糙皮侧耳的同源蛋白氨基酸序列进行比对分析, 发现双孢蘑菇 *Agdsi1* 氨基酸序列含有琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白亚基的保守结构 (图 3) (Keon *et al.* 1991; Kilaru *et al.* 2009)。

2.2 双孢蘑菇转化子验证

由于点突变的 *Agdsi1* 在突变位点处 (组氨酸 His 的密码子 CAC 突变为亮氨酸 Leu 的密码子 CTC) 含有限制性内切酶 *Mnl* I 的酶切位点 (CCTC), 而 W192 菌株琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白亚基 *Agdsi1* 编码序列的组氨酸 His (CAC) 不含此酶切位点, 因此对照菌株 W192

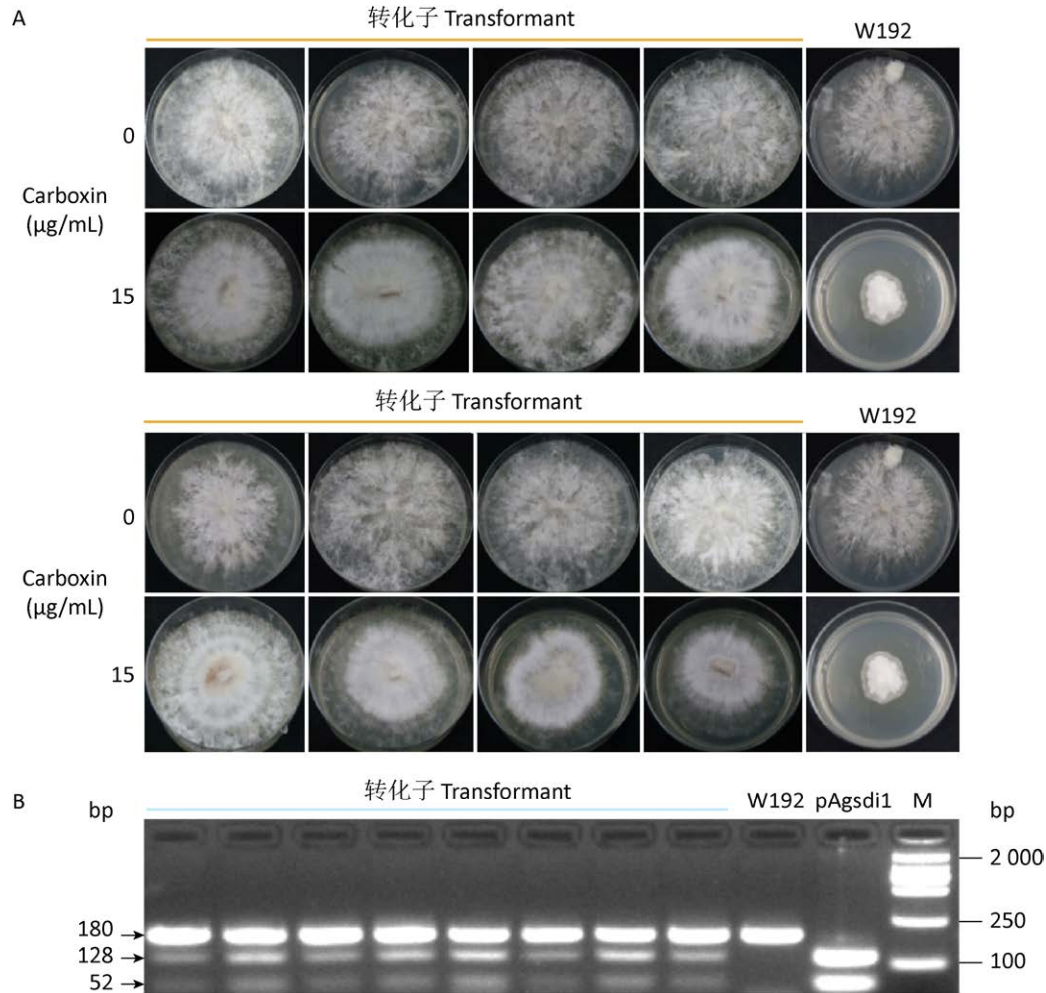


图 5 转化子菌株生长及 *Mnl* I 酶切验证 A: 转化子菌株和 W192 对照菌株在 PDA 培养基中生长情况; B: PCR 产物 *Mnl* I 酶切; M: DL 2 000 marker

Fig. 5 Growth of transformants and identification of transformants with *Mnl* I restriction enzyme. A: Growth of the transformants and wild-type of *Agaricus bisporus* on PDA supplemented with or without carboxin; B: Digestion of PCR production with *Mnl* I . M: DL 2 000 marker.

3 讨论

双孢蘑菇是一种重要的商业化栽培食用菌之一，其遗传转化体系的建立有利于双孢蘑菇基因功能研究。目前双孢蘑菇遗传转化选择标记多为潮霉素抗性标记——潮霉素磷酸转移酶基因 (van de Rhee *et al.* 1996; Chen *et al.* 2000)。来源于大肠杆菌的潮霉素磷酸转移酶基因作为一种选择标记已被广泛应用于丝状真菌以及一些担子菌中 (Mach *et al.*

1994; Chen *et al.* 2000; Kilaru *et al.* 2009)。然而此类来源于大肠杆菌等不可食用物种的且具有抗药性的外源选择标记在食用菌等供食用物种中的使用备受争议。

萎锈灵是一种杀真菌剂，对担子菌以及黑穗病效果显著 (Edgington *et al.* 1966; Keon *et al.* 1991)。研究表明，琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 的铁硫蛋白亚基 (iron-sulphur protein, Ip) 编码序列点突变，引起单个氨基酸发生替换 (铁硫蛋白第 3 个半胱

氨酸簇的 His 突变为 Leu) 可以使生物体对萎锈灵产生抗性 (Broomfield & Hargreaves 1992; Kilaru *et al.* 2009)。铁硫蛋白亚基的点突变 (His 突变为 Leu) 可能抑制了琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白亚基与萎锈灵间的作用 (Shang *et al.* 2018)。将突变的铁硫蛋白亚基的编码基因作为一种抗性筛选标记已被应用于玉米黑粉菌 *Ustilago maydis* (Kinal *et al.* 1993)、糙皮侧耳 *P. ostreatus* (Honda *et al.* 2000)、香菇 *L. edodes* (Irie *et al.* 2003)、灵芝 *Ganoderma lucidum* (Xu *et al.* 2012)、重伞灵芝 *Ganoderma multipileum* (Chou & Tzean 2016) 以及刺芹侧耳 *Pleurotus eryngii* (Shang *et al.* 2018; Wang *et al.* 2021) 等。不同于潮霉素抗性标记, 点突变的琥珀酸脱氢酶的铁硫蛋白亚基编码基因与其内源基因仅有一个碱基的差异, 转化子不会引入外源的抗性标记基因, 因此是一种更为安全的选择标记。

本研究采用了琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白亚基 (*Agdsi1*) 点突变基因作为抗性选择标记, 经萎锈灵筛选、PCR 扩增和酶切验证后获得了双孢蘑菇转化子菌株。将转化子菌株在不含萎锈灵的 PDA 培养基中传代 5 次后回接到含 15 μ g/mL 的萎锈灵抗性 PDA 平板, 发现转化子菌株仍能正常生长, PCR 扩增和酶切验证结果显示这些转化子仍保留有突变的 *Agdsi1* 序列, 表明突变的 *Agdsi1* 基因作为一种稳定、安全的筛选标记可用于双孢蘑菇等食用菌的遗传转化中。

[REFERENCES]

Broomfield PL, Hargreaves JA, 1992. A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Current Genetics*, 22: 117-121

Cai ZX, Chen MY, Liao JH, Li HR, Guo ZJ, Cai DF, Wang

ZS, 2013. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus* using mycelia grown in submerged culture. *Acta Edulis Fungi*, 20(1): 9-12 (in Chinese)

Chen M, Liao J, Li H, Cai Z, Guo Z, Wach MP, Wang Z, 2017. iTRAQ-MS/MS proteomic analysis reveals differentially expressed proteins during post-harvest maturation of the white button mushroom *Agaricus bisporus*. *Current Microbiology*, 74(5): 641-649

Chen MY, Liao JH, Guo ZJ, Li HR, Lu ZH, Cai DF, Wang ZS, 2009. The expression vector construction and transformation of thermotolerance-related gene of *Agaricus bisporus*. *Mycosystema*, 28(6): 797-801 (in Chinese)

Chen X, Stone M, Schlaghauser C, Romaine CP, 2000. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10): 4510-4513

Chou TH, Tzean SS, 2016. Protoplasting, regeneration and transformation of medicinal mushroom *Ganoderma multipileum* using succinate dehydrogenase mutation gene as a selection marker. *Annals of Microbiology*, 66(1): 111-120

Eastwood DC, Challen MP, Zhang C, Jenkins H, Henderson J, Burton KS, 2008. Hairpin-mediated down-regulation of the urea cycle enzyme argininosuccinate lyase in *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 112(6): 708-716

Edgington LV, Walton GS, Miller PM, 1966. Fungicide selective for basidiomycetes. *Science*, 153(3733): 307-308

Gonzalez A, Jimenez A, Vazquez D, Davies JE, Schindler D, 1978. Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 521(2): 459-469

Gritz L, Davies J, 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in

- Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 25(2-3): 179-188
- Heneghan MN, Burns C, Costa AM, Burton KS, Challen MP, Bailey AM, Foster GD, 2016. Functional analysis of *Agaricus bisporus* serine proteinase 1 reveals roles in utilization of humic rich substrates and adaptation to the leaf-litter ecological niche. *Environmental Microbiology*, 18(12): 4687-4696
- Honda Y, Matsuyama T, Irie T, Watanabe T, Kuwahara M, 2000. Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics*, 37(3): 209-212
- Irie T, Sato T, Saito K, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M, Enei H, 2003. Construction of a homologous selectable marker gene for *Lentinula edodes* transformation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(9): 2006-2009
- Keon JP, White GA, Hargreaves JA, 1991. Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Current Genetics*, 19: 475-481
- Kilaru S, Collins CM, Hartley AJ, Burns C, Foster GD, Bailey AM, 2009. Investigating dominant selection markers for *Coprinopsis cinerea*: a carboxin resistance system and re-evaluation of hygromycin and phleomycin resistance vectors. *Current Genetics*, 55(5): 543-550
- Kinal H, Park CM, Bruenm JA, 1993. A family of *Ustilago maydis* expression vectors: new selectable markers and promoters. *Gene*, 127(1): 151-152
- Mach RL, Schindler M, Kubicek CP, 1994. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Current Genetics*, 25(6): 567-570
- Malpartida F, Zalacain M, Jimenez A, Davies J, 1983. Molecular cloning and expression in *Streptomyces lividans* of a hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 117(1): 6-12
- Morin E, Kohler A, Baker AR, *et al.*, 2012. Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(43): 17501-17506
- Pelkmans JF, Vos AM, Scholtmeijer K, Hendrix E, Baars JJ, Gehrman T, Reinders MJ, Lugones LG, Wösten HA, 2016. The transcriptional regulator *c2h2* accelerates mushroom formation in *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 7151-7159
- Shang J, Li Y, Yang R, Wang Y, Mao W, Tang L, Wu Y, Nakazawa T, Honda Y, Li Y, Bao D, 2018. Efficient transformation of *Pleurotus eryngii* with a safe selective marker mutated from the *Pesdi1* gene. *Journal of Microbiological Methods*, 152: 7-9
- Shi XK, Cai ZX, Guo ZJ, Lu YP, Chen MY, Liao JH, Wang ZS, 2018. Analysis of *Agaricus bisporus* fruitbody development by transcriptome sequencing. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 33(3): 282-287 (in Chinese)
- van de Rhee MD, Graca PMA, Huizing HJ, Mooibroek H, 1996. Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance. *Molecular and General Genetics*, 250: 252-258
- Wang T, Yue S, Jin Y, Wei H, Lu L, 2021. Advances allowing feasible *pyrG* gene editing by a CRISPR-Cas9 system for the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Fungal Genetics and Biology*, 147: 103509
- Wu XM, Zhang X, Li NY, 2017. Transcriptome analysis of *Agaricus bisporus* fruiting at different stages. *Mycosystema*, 36(2): 193-203 (in Chinese)
- Xu JW, Xu YN, Zhong JJ, 2012. Enhancement of ganoderic acid accumulation by overexpression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase gene in the basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied*

and Environmental Microbiology, 78: 7968-7976

[附中文参考文献]

蔡志欣, 陈美元, 廖剑华, 李洪荣, 郭仲杰, 蔡丹凤, 王泽生, 2013. 农杆菌介导的双孢蘑菇菌丝转化技术探讨. 食用菌学报, 20(1): 9-12
陈美元, 廖剑华, 郭仲杰, 李洪荣, 卢政辉, 蔡丹凤, 王泽生, 2009. 双孢蘑菇耐热相关基因的表达载体构建及转化研究. 菌物学报, 28(6):

797-801

施肖堃, 蔡志欣, 郭仲杰, 卢园萍, 陈美元, 廖剑华, 王泽生, 2018. 双孢蘑菇 As2796 子实体发育转录组测序分析. 福建农业学报, 33(3): 282-287
吴小梅, 张昕, 李南羿, 2017. 双孢蘑菇子实体不同发育时期的转录组分析. 菌物学报, 36(2): 193-203

(本文责编: 王敏)

参考文献格式介绍 (著者-出版年制)

一、文内参考文献的格式:

文内文献排序规则: 按出版年代由低到高排序, 同年文献按照作者姓氏字母顺序升序排列。例:

一位作者: 戴芳澜 (1979) 或 (戴芳澜 1979);

两位作者: 庄剑云和魏淑霞 (1994)、(Arthur & Cummins 1936)、(庄剑云和魏淑霞 1994);

三位作者 (含) 以上: 戴玉成等 (2007)、(戴玉成等 2007)、(Smith *et al.* 1981);

同时引用多篇文献: (杨祝良 2020; 戴玉成等 2021)、(Li *et al.* 2012; Li *et al.* 2013; Li *et al.* 2015; Song *et al.* 2018)。

二、文后参考文献的格式:

中文投稿: 文后中文参考文献采用中-英文双语表示。

英文投稿: 不需要附中文参考文献, 中文文献只需英文表述并同英文文献按姓氏字母升序排列。

文后文献排序规则: 按照作者姓氏字母升序排列, 相同作者的同年文献用 a, b, c.....标出。20 位作者以内的文献需要列出全部作者 (超过 20 位作者时, 只写出前 3 位作者, 用 *et al.* 表示省略)。英文参考文献的刊名采用全称、正体表示。