



纪开萍

研究员，景洪宏臻农业科技有限公司副总经理，贵州宏臻菌业投资发展有限公司技术总监，先后带领团队发明暗褐网柄牛肝菌的人工栽培及工厂化栽培技术，选育栽培菌株5个，并成功实现科技成果转化。主持国家级、省部级科研项目10余项，在国内外刊物发表学术论文30余篇，获得国家授权专利共计17项。曾获全国“讲理想、比贡献”活动科技标兵，云南省第十一批技术创新人才，第九届世界食用菌生物学与产品大会“学会创新奖”等称号及奖项。

暗褐网柄牛肝菌人工驯化研究的回顾与前瞻

曹旻^{1,2} 纪光燕¹ 罗顺珍¹ 高丽霞² 陶玲² 王秋兰² 杨瑞恒³
鲍大鹏³ 纪开萍^{1,2*}

①景洪宏臻农业科技有限公司 云南 景洪 666100

②贵州宏臻菌业投资发展有限公司 贵州 贞丰 562200

③国家食用菌工程技术研究中心 农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室 上海市农业遗传育种重点实验室 上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201403

摘要：在全球的牛肝菌物种中，暗褐网柄牛肝菌 *Phlebopus portentosus* 是唯一一种成功被人工驯化、实现了周年工厂化栽培的牛肝菌，总产能已达日产 16t。暗褐网柄牛肝菌人工栽培技术，从初期的实验室探索阶段，到工厂化栽培的发展阶段，再到工厂化菌株菌种选育的提升阶段，都取得了一定的进步。本文将从暗褐网柄牛肝菌的生态学特性、人工栽培、菌种选育及营养活性物质等方面对目前的研究现状进行综述，总结现阶段产业和学科的问题，并针对性地提出基础研究和生产产业未来的发展方向。

关键词：暗褐网柄牛肝菌，生态学特性，人工栽培，菌种选育，活性物质

[引用本文] 曹旻，纪光燕，罗顺珍，高丽霞，陶玲，王秋兰，杨瑞恒，鲍大鹏，纪开萍，2021. 暗褐网柄牛肝菌人工驯化研究的回顾与前瞻. 菌物学报, 40(12): 3064-3080

Cao Y, Ji GY, Luo SZ, Gao LX, Tao L, Wang QL, Yang RH, Bao DP, Ji KP, 2021. Domestication and artificially cultivation of *Phlebopus portentosus*: retrospect and prospect. Mycosystema, 40(12): 3064-3080

基金项目：国家自然科学基金(31560008)；云南省科技计划面上项目(2017FB025)；云南省技术创新培养对象(2017HB092) Supported by the National Natural Science Foundation of China (31560008), the Natural Science Foundation of Yunnan Province (2017FB025), and Technical Innovation Training Object of Yunnan Province (2017HB092).

* Corresponding author. E-mail: jkpcnlc@126.com

ORCID: CAO Yang (0000-0002-1449-7244)

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

Domestication and artificially cultivation of *Phlebopus portentosus*: retrospect and prospect

CAO Yang^{1, 2} JI Guang-Yan¹ LUO Shun-Zhen¹ GAO Li-Xia² TAO Ling²
WANG Qiu-Lan² YANG Rui-Heng³ BAO Da-Peng³ JI Kai-Ping^{1, 2*}

①Jinghong Hongzhen Agricultural Science and Technology Co. Ltd., Jinghong, Yunnan 666100, China

②Guizhou Hongzhen Fungus Industry Investment and Development Co. Ltd., Zhenfeng, Guizhou 562200, China

③Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Edible Fungal Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, Shanghai 201403, China

Abstract: Among bolete species all over the world, *Phlebopus portentosus* is so far the only species which has been successfully domesticated and artificially cultivated in large scale. The production is about 16t daily in China. Many progresses have been made from the early laboratory stage through artificial cultivation in large scale to variety breeding. In this paper, ecological characteristics, cultivation technologies, strain breeding and active substances of *P. portentosus* are reviewed, existing problems in industry and scientific research are summarized, and probable directions for future research are proposed.

Key words: *Phlebopus portentosus*, ecological characteristics, cultivation technologies, strain breeding, active substances

牛肝菌是一种在全球广泛分布的珍稀食用菌，除了中国，在德国、法国和意大利等欧洲国家的饮食传统中，对牛肝菌也十分偏爱，每年全球消费量可达 10 万吨 (Hall *et al.* 1998)。中国西南部的云南省野生牛肝菌资源极其丰富 (戴玉成等 2021)，年产量可达 5 万吨以上，创造产值约 20 亿元人民币，其中年出口量上万吨，创汇约 7 000 万美元，已经成为当地人民和政府重要的经济来源 (郑航 2017)。

在利益的驱使下，缺乏可持续发展观念的农户对野生牛肝菌资源过度开采，导致产量下降，价格走高，继而导致更加严重的开采，形成恶性循环。另一方面，随着城市扩张和环境的恶化，野生牛肝菌自然产地的生态环境遭到破坏和污染，严重威胁野生牛肝

菌的种群数量及食用安全性 (郑航 2017; 陈凤霞等 2021)。因此，数十年来人们一直在尝试实现牛肝菌的人工栽培。

绝大多数牛肝菌是完全的外生菌根菌，需要与特定的宿主树共生，由宿主树提供营养才能出菇。有的研究者将牛肝菌接种到无菌苗的根部，合成外生菌根苗后，再移栽到野外出菇，或者直接将牛肝菌菌种接种于成年树木根部出菇 (Fries *et al.* 1987; Meotto *et al.* 1999; 陈宇航等 2002; Agueda *et al.* 2008; 应国华等 2009)。也曾有人在实验室条件下，离开宿主树培养出牛肝菌子实体 (McLaughlin 1970; Giltrap 1981; Yamanaka *et al.* 2000; Ohta & Fujiwara 2003; Kikuchi *et al.* 2009; 和若瑜 2018)。但以上研究均未能实现规模化、商业化生产。

暗褐网柄牛肝菌 *Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn, 又名暗褐脉柄牛肝菌, 商品名黑牛肝菌, 隶属于牛肝菌目 Boletales、小牛肝菌科 Boletinellaceae、脉柄牛肝菌属 *Phlebopus*, 主要分布于全球热带和亚热带地区, 包括泰国北部、老挝、缅甸、斯里兰卡、印度尼西亚、墨西哥、澳大利亚等, 国内的广东、广西、海南、云南等省均有分布 (Heinemann & Rammeloo 1982; Barbara 1987; Watling 2001; 杨祝良和臧穆 2003; Bandala *et al.* 2004; 臧穆 2006)。暗褐网柄牛肝菌的人工驯化, 从初期的实验室探索阶段到工厂化栽培的发展阶段, 历时 20 年, 取得了长足的进步, 是全球唯一一种实现了周年工厂化栽培的牛肝菌, 目前, 在云南省景洪市和贵州省贞丰县建成生产基地, 生产产能已达日产 16t, 预计到 2023 年, 将达到日产 36t (周清翊和李莹 2020; 黄飞鸿 2021)。本文将从暗褐网柄牛肝菌的生态特性、人工栽培、菌种选育及营养活性物质等方面对目前的研究现状进行总结, 并针对未来可能的研究方向提出建议, 以期为更多的食用菌研究人员提供参考, 加速暗褐网柄牛肝菌科学技术研究进程。

1 生态学特性

暗褐网柄牛肝菌具有十分特殊和复杂的生态学特性, 也与目前规模化生产中存在的技术难关息息相关, 因此引起了许多研究者的关注。

1.1 暗褐网柄牛肝菌与“宿主树”的关系

纪开萍等 (2007) 对暗褐网柄牛肝菌最初的研究中, 将它作为菌根菌进行栽培实验, 与咖啡苗一起培养, 获得了成熟的子实体, 但后续研究发现, 它与咖啡苗并未形成外生菌根结构, 在提供适宜营养后, 它能够独立形成成熟子实体 (纪开萍等 2009c; Ji *et al.*

2011)。

此后, 围绕暗褐网柄牛肝菌是不是外生菌根菌的问题, 研究者们展开了更加深入的研究, 但至今尚无定论。以下研究结果倾向于支持暗褐网柄牛肝菌是外生菌根菌: Sanmee *et al.* (2010) 和 Kumla *et al.* (2016) 先后选取外生菌根树种蒺藜锥、具翼龙脑香、思茅松, 及内生菌根树种龙眼、乌墨、杜英属植物、杧果, 共 7 种植物进行菌根合成实验。将暗褐网柄牛肝菌接种思茅松根部 1 年后, 以 ITS 分子标记验证了根尖内部存在其菌丝, 观察到菌丝套和哈蒂氏网结构, 并且思茅松侧根顶端形成二叉分枝, 这些都是松属植物形成外生菌根的典型结构。同时, Kumla *et al.* (2016) 对几种典型的外生菌根菌、腐生菌以及野生暗褐网柄牛肝菌的子实体, 进行了稳定同位素 ^{13}C 和 ^{15}N 检测。外生菌根菌和腐生菌利用营养物质的形式不同, 往往会造成它们组织中稳定同位素比例的不同。暗褐网柄牛肝菌的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值介于外生菌根菌和腐生菌之间, 但与外生菌根菌更为接近。

在碳源利用方面, 外生菌根菌和腐生菌有着显著的差别。外生菌根菌主要依靠宿主树提供的碳源, 利用环境中木质纤维素的能力十分有限, 腐生菌则相反, 因此外生菌根菌基因组中往往缺失了大多数木质纤维素降解酶基因, 或仅保留极低的拷贝数 (Martin *et al.* 2008, 2010; Wolfe *et al.* 2012; 杨瑞恒等 2017)。暗褐网柄牛肝菌基因组中的碳水化合物酶系与外生菌根菌更为相似, 同样丢失了一系列降解木质纤维素的关键基因, 如 *GH6*、*GH*、*GH11*、*GH54*、*GH62*、*GH67*、*AA3_1*、*AA8*、*AA16* 等, 而这些基因常常被认为是外生菌根菌与腐生菌之间差异的标志性基因 (曹旻 2014; Cao *et al.* 2015)。

但是, 要将暗褐网柄牛肝菌归为外生菌

根菌, 还存在一些反面的证据: 张春霞等 (2015a, 2016) 将暗褐网柄牛肝菌和印度块菌接种思茅松根部, 进行菌根合成试验。5 个月后即观察到印度块菌与思茅松形成典型的外生菌根菌结构。10 个月后, 接种暗褐网柄牛肝菌的处理中, 观察到有大量菌丝缠绕思茅松根系, 顶端同样形成了二叉分枝结构, 且接种暗褐网柄牛肝菌菌种的树苗长势更强, 但没有观察到真正的菌丝套和哈蒂氏网。而前述 Sanmee *et al.* (2010) 和 Kumla *et al.* (2016) 接种暗褐网柄牛肝菌到思茅松根部, 并观察到外生菌根结构的研究则在接种 1 年后观察, 是否由于观察时间不同造成了两项研究结果的差异, 或者, 接种菌株之间的差异是否也对外生菌根结构形成有一定影响, 还有待进一步深入研究。另外, 在 Zhang *et al.* (2015) 的野外调查中, 曾在 37 种植物附近发现暗褐网柄牛肝菌, 但这些植物都不是外生菌根树种, 而属于丛枝菌根树种 (张春霞等 2016)。

综合以上研究结果, 笔者更倾向于认为暗褐网柄牛肝菌是一种兼性外生菌根菌: 它具有一定的共生能力, 能够对植物根系造成一定的影响, 但显著弱于外生菌根菌, 在野外条件下也似乎已经丧失了作为外生菌根菌的生态位; 具有一定的腐生能力, 但与腐生真菌获取营养的途径有明显差别。以上生态学特性, 是暗褐网柄牛肝菌能够离开“宿主树”、被人工驯化的根本原因, 但其较弱的腐生能力, 也造成了人工栽培中的技术瓶颈, 如本课题组目前正在研究的生物转化率较低 (25%左右)、单个栽培瓶营养仅能供给单个子实体长大成熟等问题。

1.2 暗褐网柄牛肝菌与根粉蚧的关系

关于暗褐网柄牛肝菌的生态学特性, 还有另外一个现象引起了研究者的注意。在一些植物的根部, 暗褐网柄牛肝菌菌丝组织化

为虫瘿状结构, 蚧虫在其中繁殖生活, 即菌腔虫瘿。目前对此现象已有一系列研究报道, 包括宿主植物和蚧虫种类的调查、自然环境中二者关系的动态观察、人工条件下接种观察、营养关系研究等 (张书蕊等 2014; Zhang *et al.* 2015; 张春霞等 2015b; 何明霞等 2019b; Fang *et al.* 2020; 方艺伟等 2020; 刘静等 2020)。这些研究结果表明, 作为植物根部常见的害虫之一, 蚧虫与暗褐网柄牛肝菌相遇便很快形成菌腔虫瘿, 且这种结构的数量, 与粉蚧的繁殖传播速度、暗褐网柄牛肝菌的出菇数、宿主植物受伤害程度都呈现正相关的趋势 (何明霞等 2019b; 刘静等 2020)。从营养关系上来看, 之所以会形成菌腔虫瘿, 可能是蚧虫利用其分泌的、富含氨基酸和多种糖类的蜜露“培养”暗褐网柄牛肝菌菌丝体, 使其扭结、增厚, 形成菌腔虫瘿后, 成为蚧虫繁殖栖息的场所, 而蚧虫利用其细长口器, 穿过菌腔虫瘿靠根部一侧, 伸入植物根部取食汁液 (Fang *et al.* 2020)。

因此, 在暗褐网柄牛肝菌的林下仿生栽培中, 需控制好菌-虫-树三者的动态平衡关系, 才能在收获暗褐网柄牛肝菌的同时预防蚧虫爆发和宿主植物受损。从工厂化栽培的角度来说, 对菌-虫-树三者之间生态营养关系的深入研究, 或许能为栽培基质改良提供很好的借鉴。

2 暗褐网柄牛肝菌的人工栽培研究

暗褐网柄牛肝菌人工栽培过程, 可以简略地划分为无性繁殖的各级菌丝体生长过程, 以及由无性繁殖向有性繁殖过度的覆土出菇过程。目前, 暗褐网柄牛肝菌工厂化栽培所采用的生产模式为: 母种-三角瓶液体种-发酵罐液体种-固体种-栽培瓶-覆土出菇 (纪开萍等 2017a, 2017b, 2018a, 2018b; 魏学林等 2018)。这套栽培模式中, 从母种到栽

培瓶的生产,都属于无性的菌丝生长阶段,仅有覆土出菇一个环节属于有性发育阶段,下文将分别介绍这两个阶段的研究进展。

2.1 菌丝生长研究

从一支母种试管,到数以万计的栽培瓶,是菌丝体被逐级扩大的过程。菌丝体的生长与其培养基质的成分、pH 值及培养环境条件等密切相关。暗褐网柄牛肝菌的小规模栽培实验中,母种的下一级扩繁使用三角瓶液体菌种或固体菌种,再转接栽培袋,就能够满足实验需求(纪开萍等 2008, 2009a, 2009b; Thongklang *et al.* 2010; Ji *et al.* 2011; Kumla *et al.* 2012)。工厂化栽培中,为满足生产规模需要,母种到栽培瓶之间,还需进行三角瓶液体种、发酵罐液体种和固体种 3 个阶段的扩繁(纪开萍等 2017a, 2017b, 2018b; 魏学林等 2018)。

食用菌栽培中的母种一般使用固体琼脂培养,暗褐网柄牛肝菌也不例外。国内研究者经过多次实验,从一系列碳源、氮源和无机盐中筛选组合出 M1 培养基(何明霞等 2009a, 2009b; 纪开萍等 2009b; 张春霞等 2009),至今仍是国内暗褐网柄牛肝菌研究中最常用的基础培养基。M1 培养基属于 PDA 培养基的改良配方,简单易得,主要成分包括葡萄糖、 MgSO_4 、 KH_2PO_4 、酵母膏、马铃薯(水煮液)、琼脂和水。清迈大学的研究团队则更倾向于使用一些在菌根真菌中常用的培养基,同样经过多次实验,筛选出 MMN(改良 melin-norkans 培养基),MS(murashige & skoog 培养基)和 FH(fungus-host 培养基)等为暗褐网柄牛肝菌菌丝生长最佳培养基(Sanmee *et al.* 2010; Thongklang *et al.* 2010; Kumla *et al.* 2011),这些培养基与 M1 培养基相比较为复杂,添加了多种碳氮源、微量元素和生长因子等。以上的研究还确定了暗褐网柄牛肝菌母种菌丝生长最佳 pH 值为 4,最

佳温度为 30℃。近年来,对于暗褐网柄牛肝菌母种培养基的研究仍在持续开展中,研究者在更大范围内对各种要素进行筛选(罗顺珍等 2017; 陶玲等 2021; 晏汐蓓等 2021; 张冰冰等 2021)。

在母种之后,使用三角瓶液体种扩繁时,配方往往沿用上述 M1 培养基的配方或稍做改良(纪开萍等 2008; Ji *et al.* 2011)。工厂化栽培中,三角瓶液体种之后,还需扩繁发酵罐液体种,其制作过程分为菌丝破碎、菌丝恢复、培养适应萌发、菌丝生长、菌丝倍数增长期、接种养菌前适应期 6 个阶段,各阶段培养参数需精准调控,配方包括葡萄糖、 MgSO_4 、 KH_2PO_4 、酵母、马铃薯、麦麸、维生素 B1、胡萝卜素、消泡油和发酵橡胶木水煮液等(魏学林等 2018)。

无论规模大小,暗褐网柄牛肝菌人工栽培中使用的固体种和后续栽培瓶或栽培袋的配方都较为相似,主要包括木屑、谷物和营养液三大类成分。纪开萍等(2009a, 2009b)和 Ji *et al.* (2011)在研究初期曾使用锯木屑、谷粒和微量元素制作固体种和栽培袋。Thongklang *et al.* (2010)尝试了 16 种处理,最后筛选出大麦混合 MS 营养液为最佳基质配方。Kumla *et al.* (2012, 2015)选择了 7 种不同的谷物,以及米糠、稻草或锯末,与不同的营养液组合,筛选出高粱、FH 营养液与雨树锯末混合的最佳配方。胡生华等(2017)以小麦、玉米、杂木屑和 M1 培养液制作栽培种。工厂化栽培中,固体种成分包括枫香树木发酵物、巨菌草、甘蔗渣、大麦、高粱、红壤、石膏粉、 MgSO_4 、 KH_2PO_4 等(纪开萍等 2018b),栽培瓶成分包括木片、秸秆、红壤、谷粒、米糠、石膏粉、微量元素和酵母浸膏等(纪开萍等 2017b),并对装瓶高度、打孔数量、堆垛方式和不同阶段的养菌温度等技术参数作出详细要求(纪开萍

等 2017a)。

规模化食用菌栽培中,为了降低成本,保障产量和质量,对菌丝体培养的要求包括生长迅速,后续出菇能力强,并且具有很高的一致性。其中,最容易被检测的是生长速度,以上对于暗褐网柄牛肝菌母种培养基的研究基本也仅以生长速度作为判断的指标,遗憾的是,生长快的菌丝并不一定意味着出菇能力强,一致性高。暗褐网柄牛肝菌的菌落形态十分丰富 (Thongklang *et al.* 2010),还常常出现菌核、吐水等现象 (Yang *et al.* 2021),在实际生产中,形态特征是最直观、最迅速的判断方法。因此,对于暗褐网柄牛肝菌菌丝体生长阶段的研究,应该更多地尝试将形态特征数据化,并探索其与出菇能力、一致性的对应关系。而对于形态特征指标较少的液体菌种阶段,则可以探索易检测的生理生化指标与生产效果之间的对应关系。另一方面,随着对暗褐网柄牛肝菌生态营养特征的研究越来越深入,改良栽培基质,提升生物转化率,仍有很大的进步空间。

2.2 覆土出菇研究

在目前关于暗褐网柄牛肝菌已报道的所有文献中,覆土仍是其人工栽培流程中必不可少的一个环节,刺激其菌丝由无性繁殖,向产子实体的有性繁殖过渡。在暗褐网柄牛肝菌的工厂化栽培中,选择栽培瓶作为生产容器最主要的原因也是为了降低覆土环节成本和提升生产效果。使用栽培瓶的揭盖覆土相比于栽培袋的开袋覆土更易于实现机械化,节省人力成本;相比于脱袋层架覆土,更易于提高单位面积产量,控制污染,控制单菇的重量和品质。为了实现栽培瓶揭盖覆土,专用的覆土盖和覆土设备也被设计制造出来 (陶玲等 2019; 郑日等 2020)。

多年来,研究者们对暗褐网柄牛肝菌人工栽培中覆土材料的筛选及其作用机理也

展开了一系列研究。在覆土材料的筛选上, Ji *et al.* (2011) 在早期的研究中,采用菌袋内单端开袋覆土的形式,发现使用出菇点和非出菇点土壤覆土对出菇没有显著影响,供试土壤类型中,菜园土是出菇效果最好的覆土材料。曹旻等 (2011) 进一步研究发现,菜园土在全碳、全磷、有效磷、速效钾、有效锌含量上显著高于果园土和堆制土。Kumla *et al.* (2012) 则选用多个菌株,多种覆土材料,结果仅泥炭蛭石混合物、土壤覆土的处理中有子实体形成,并以泥炭蛭石混合物为优。Kumla *et al.* (2015) 还发现,在覆土中添加 FH 营养液有助于提高产量。近年来,关于覆土材料的研究仍在持续,如王文兵等 (2019) 设置不同的草炭与红壤比例,发现两者各 50% 是最佳的配比。何明霞等 (2019a) 根据正交实验结果,提出最优覆土处理为发酵土和泥炭等体积混合、含水量 45%、pH 5、覆土厚度 4cm。

在暗褐网柄牛肝菌覆土出菇的机理方面,研究最多的是覆土中微生物的作用。曹旻等 (2010) 通过对比无菌和添加微生物的覆土出菇效果,发现微生物对出菇时间、菇重和出菇率均有一定的影响。从覆土中分离得到的一些细菌、放线菌,以及它们的组合对暗褐网柄牛肝菌菌丝生长和出菇有一定的促进作用 (刘静等 2011; 王文兵等 2013; 伍英等 2013)。在最近的研究中, Yang *et al.* (2019) 利用高通量测序平台研究了暗褐网柄牛肝菌覆土栽培过程中细菌的动态变化过程,发现 *Acidobacterium* 和 *Acidisphaera* 是原基时期的标志微生物, *Bradyrhizobium*、*Roseiarcus* 和 *Pseudolabrys* 与子实体的形成有关,覆土中的细菌之间可能发生广泛的相互影响,对暗褐网柄牛肝菌的生长具有重要作用。

对于暗褐网柄牛肝菌人工栽培中的覆土

环节进行研究,证实了覆土材料和微生物对出菇都有重要影响。在工厂化栽培中,使用的覆土材料仍然以草炭和红壤为主,将成本及生产效果作为考虑因素,覆土材料选择上目前可改进的空间相对较小。而作为覆土中的另一要素——微生物,则可以为未来覆土技术的改进带来更多的可能性,从覆土中添加菌剂(纪开萍等 2018a),到无覆土出菇的终极目标,都有可能随着微生物在覆土中作用机制的揭示,带来技术的变革。

3 暗褐网柄牛肝菌菌种选育

暗褐网柄牛肝菌的菌种选育目前主要采用自然选育和杂交育种两种方法,能够检索到的、已申报专利的菌株(授权及未授权的)共 6 个(何明霞等 2012, 2016a, 2016b; 吴开云等 2018; 纪开萍等 2019; 罗顺珍等 2019),这些菌株中有 5 个属于自然选育菌株,仅菌株 YL1701_2 来源于杂交育种,菌株 YL1701_2 也是目前工厂化栽培中使用的主要生产菌株之一,它与之前的菌株相比,除了高产、稳定,最大的特点是摒除了野生暗褐网柄牛肝菌中特有的土味,使原产地以外的消费者更容易接受。

针对暗褐网柄牛肝菌菌种选育目前的研究现状,还有许多相关工作有待开展。首先,除杂交育种外,还可引入诱变育种、原生质体育种、分子育种等多种手段,针对工厂化栽培菌株的需求,选育具有高产、稳产、抗污染、不易退化等特点的新品种。其次,对暗褐网柄牛肝菌野生种质资源的遗传多样性研究,虽有一些报道(曹旻等 2017; 高峰等 2021a, 2021b),但其地域上的覆盖度还可以进一步扩大,以便深入了解种质资源间的遗传距离,选取优良亲本,增加杂交育种成功概率。另外,随着暗褐网柄牛肝菌全基因组、线粒体基因组的发表(Cao *et al.* 2015; Jiang *et*

al. 2017),其中的 SSR 标记已有部分被开发应用于菌株 DNA 指纹图谱的构建、知识产权的保护(曹旻 2014; 曹旻等 2015, 2017; 何明霞等 2016a, 2016b; 纪开萍等 2019; 罗顺珍等 2019; 高峰等 2021a),但仍有许多分子标记有待开发。例如暗褐网柄牛肝菌的交配系统已被确定为四极性异宗配合型(曹旻等 2016),在此基础上可结合基因组数据对其交配型基因及相关分子标记进一步开发,为未来的暗褐网柄牛肝菌分子育种提供更加简便快捷的筛选工具。最后,在分类学上与暗褐网柄牛肝菌同属的其他种类分布于世界各地,似乎都不是典型的、完全的外生菌根菌(Bhaves *et al.* 2021),其中大多数种类都是可食用的,这些种类中仅有 *P. spongiosus* 曾进行过栽培出菇方面的实验(Kumla *et al.* 2020),证实了它也有离开宿主树出菇的能力。因此,在暗褐网柄牛肝菌的菌种选育中,还有大量的种质资源有待开发,这些与暗褐网柄牛肝菌同属的种类,有很大的潜力被驯化培育为新的品种,或作为杂交育种中的优良亲本。

4 暗褐网柄牛肝菌的营养活性物质

在营养成分方面, Sanmee *et al.* (2003) 和张春霞等(2010, 2014)曾分别对野生及人工、半人工栽培的暗褐网柄牛肝菌进行营养成分检测,结果表明,它们均含有丰富的蛋白质、粗脂肪、总糖、粗纤维、多种矿质元素和氨基酸。在最近的一项研究中, Zou *et al.* (2021) 对暗褐网柄牛肝菌的蛋白质进行详细深入的研究,认为其必需氨基酸含量呈现出很高的均衡性,所含必需氨基酸占总氨基酸的 42.74%,必需氨基酸与非必需氨基酸比值为 0.92,超过 FAO(联合国粮农组织)和 WHO(世界卫生组织)推荐的 40% 和 0.6 的比值。另外,各种必需氨基酸的含量均超

过 FAO/WHO 推荐的儿童 (>6 个月) 及成人摄入量, 亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、组氨酸的含量甚至高于鸡蛋。在其他植物蛋白中, 赖氨酸常是含量较少的限制性氨基酸, 在暗褐网柄牛肝菌中却含量丰富。

在活性成分方面, 目前的研究主要包括对暗褐网柄牛肝菌中酚类、粗多糖类、多糖-蛋白复合物、吡咯生物碱以及次生代谢物的研究。Kaewnarin *et al.* (2016) 发现, 采用水提的方式能够从暗褐网柄牛肝菌中获得更多的酚类物质, 这些物质具有一定的抗氧化、抗高血糖症 (α -葡萄糖苷酶抑制)、抑制黑色素生成 (酪氨酸酶抑制) 活性。在另外一项研究中, Kaewnarin *et al.* (2020) 还对暗褐网柄牛肝菌中的粗多糖进行提取和活性检测, 发现其同样具有一定的抗氧化、抗高血糖症 (α -葡萄糖苷酶抑制) 和抗高血压症 (血管紧张素转换酶抑制) 活性。Karnchanatat *et al.* (2013) 则针对暗褐网柄牛肝菌中的多糖-蛋白复合物进行提纯和研究, 其中含量最高的一个组分 “PPC-P11”, 经检测后发现它具有很好的抗氧化活性, 在体外对乳腺癌、肝癌、肺癌、胃癌、结肠癌的细胞株有较强的抑制效果。Sun *et al.* (2018) 在筛选食用菌中神经保护物质的过程中, 发现暗褐网柄牛肝菌中的乙酸乙酯提取物具有活性, 并分离得到 7 种吡咯生物碱, 其中 3 种为新化合物。经验证, 这 7 种吡咯生物碱均具有神经细胞保护作用。Chuankid *et al.* (2020) 对其菌丝液体培养后的次生代谢产物进行分离纯化, 研究其中的色素化合物及普耳文酸衍生物, 最终获得 9 种化合物, 其中 2 种被鉴定为新化合物。经检测, 这些物质具有抗菌和抗癌细胞活性。

以上研究表明, 暗褐网柄牛肝菌具有较高的营养价值和潜在的药用价值。相信随着

生产规模的不断扩大, 进入消费市场的暗褐网柄牛肝菌将越来越多, 针对其营养活性物质的研究也会越来越多。作为目前唯一一种能够人工栽培的牛肝菌, 由于生长条件可控, 暗褐网柄牛肝菌也是研究牛肝菌化合物特征的优良模式物种。例如伤后变蓝现象在人工栽培的暗褐网柄牛肝菌中时有发生, 且随栽培、保藏条件的不同, 变色的程度、范围和速度也会有差别。伤后变蓝是牛肝菌普遍存在的现象, 其关键化合物可作为牛肝菌分类的依据之一 (Nelsen 2010), 但这些物质的生物活性、代谢机理和进化意义等还研究得很少, 利用人工栽培的暗褐网柄牛肝菌可对这一现象进行深入研究。

5 未来研究方向

暗褐网柄牛肝菌人工驯化可以说已经成功, 但相比于其他食用菌, 暗褐网柄牛肝菌的基础理论和栽培技术研究仍处于起步阶段。除上述方向值得进一步深入研究外, 本文还总结了以下值得关注的方向。

5.1 营养生理学研究

对暗褐网柄牛肝菌开展营养生理学的研究, 与其生态学研究是一脉相承的, 需要解决的关键问题包括, 它需要由环境中获得什么样的营养来完成整个生活史, 以及发育过程中涉及的关键因子、关键程序。由于暗褐网柄牛肝菌在生态学特性上既有外生菌根菌的特点, 也有腐生菌的特点, 在对暗褐网柄牛肝菌的营养生理学深入了解后, 还可进一步以此为参照, 与其他外生菌根型牛肝菌进行对比, 为其他牛肝菌的人工栽培研究带来新的着力点。

5.2 农艺性状的遗传学本质研究

对暗褐网柄牛肝菌农艺性状的遗传学本质进行研究, 首先, 可通过构建各种分离群

体, 利用生物信息学、分子生物学手段, 绘制高精度遗传图谱, 对各种农艺性状进行基因定位, 并建立遗传转化体系, 验证基因功能。另外, 在多种食用菌中已发现细胞质对其农艺性状有较大影响 (Hintz *et al.* 1988; 刘靖宇等 2011; 叶丽云等 2019), 本课题组在进行暗褐网柄牛肝菌杂交育种过程中, 也发现很多通过核迁移获得的同核异质菌株, 在菌丝生长、出菇率、单菇重等方面均会出现差异, 说明细胞质对暗褐网柄牛肝菌农艺性状也有影响。除此之外, 本课题组在工厂化栽培中观察到颜色变化、菌丝老化等现象, 推测可能与表观遗传学、转座子等遗传学因素相关。因此, 在对暗褐网柄牛肝菌农艺性状遗传学本质的研究中, 应兼顾多方面的因素。

5.3 菌渣综合利用研究

一个日产 10t 的暗褐网柄牛肝菌工厂化生产基地, 每天产生数十吨菌渣。由于暗褐网柄牛肝菌目前生物转化率较低, 加上其中生长的菌丝体, 使得其菌渣中的有机质含量十分丰富。目前对于暗褐网柄牛肝菌菌渣二次利用的相关报道较少 (许欣景等 2017; 岩利等 2021), 但也证实了其用作有机肥料的潜力。另一方面, 本课题组针对其菌渣用于其他食用菌种植的相关技术也正在研发当中。

暗褐网柄牛肝菌是我国也是全球目前唯一实现人工栽培的牛肝菌, 并在此基础上快速实现了工厂化栽培, 同时研究学者也积累了比较丰富的对暗褐网柄牛肝菌的认识, 本文对前期相关研究结果进行了概括, 但是关于暗褐网柄牛肝菌的生理学、遗传学、育种学方面的研究仍旧存在许多空白, 希望有越来越多的科研人员关注暗褐网柄牛肝菌的生物学研究, 为产业的可持续发展提供科技支撑。

[REFERENCES]

- Agueda B, Parladé J, Fernandez-Toiran L, Cisneros O, de Miguel AM, Modrego MP, Martinez Pena F, Pera J, 2008. Mycorrhizal synthesis between *Boletus edulis* species complex and rockroses (*Cistus* sp.). *Mycorrhiza*, 18: 443-449
- Bandala VM, Montoya L, Jarvio D, 2004. Two interesting records of boletes found in coffee plantations in Eastern Mexico. *Persoonia*, 18(3): 365-380
- Barbara PS, 1987. An annotated checklist of Agarics and Boleti recorded from New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 25(2): 185-215
- Bhaves R, Olivier R, Thongklang N, Hyde KD, 2021. *Phlebopus* (Boletales, Boletinellaceae), a peculiar bolete genus with widely consumed edible species and potential for economic development in tropical countries. *Food Bioscience*, 41: 100962
- Cao Y, 2014. Population genetics of two edible mushroom in Yunnan Province and preliminary study of genomics of *Phlebopus portentosus*. PhD Dissertation, Yunnan University, Kunming. 64-77 (in Chinese)
- Cao Y, Fang YW, Gao F, He MX, Zhang CX, Xu XJ, Wang WB, Wang Y, 2016. Study on mating system on *Phlebopus portentosus*. *Northern Horticulture*, 24: 133-135 (in Chinese)
- Cao Y, He MX, Gao F, Liu J, Zhang CX, Xu XJ, 2017. Genetic diversity analysis of *Phlebopus portentosus* based on SSR markers. *Northern Horticulture*, 8: 111-114 (in Chinese)
- Cao Y, Ji KP, Liu J, Zhang CX, He MX, Wang WB, 2010. Effect of casing on cruiting of *Phlebopus portentosus* in bottle culture. *Acta Edulis Fungi*, 17(3): 29-32+91 (in Chinese)
- Cao Y, Ji KP, Liu J, Zhang CX, He MX, Wang WB, 2011. Effect of different casing soils on the fruiting of *Phlebopus portentosus*. *Acta Edulis Fungi*, 18(4): 25-27 (in Chinese)
- Cao Y, Xu JP, Zhang Y, Zhang CX, He MX, Liu J, Gao F,

- Wang WB, Xu XJ, 2015. SSR markers for *Phlebopus portentosus*: China, CN104946763B. 2018-03-16 (in Chinese)
- Cao Y, Zhang Y, Yu ZF, Wang PF, Tang XZ, He XX, Mi F, Liu CL, Yang D, Xu JP, 2015. Genome sequence of *Phlebopus portentosus* strain PP33, a cultivated bolete. *Genome Announcements*, 3(2): e00326-15
- Chen FX, Yang TW, Li JQ, Liu HG, Fan MP, Wang YZ, 2021. Content characteristics and risk assessment of three heavy metals in different parts of Boletaceae in Yunnan Province. *Science and Technology of Food Industry*, 42(12): 225-232 (in Chinese)
- Chen YH, Chen ZM, Lin GH, 2002. Cultivation of *Leccinum extremiorientale*. *Journal of Fujian Agricultural University (Natural Science)*, 2002(4): 532-535 (in Chinese)
- Chuankid B, Schrey H, Thongbai B, Raspé O, Arnold N, Hyde KD, Stadler M, 2020. Secondary metabolites of *Phlebopus* species from Northern Thailand. *Mycological Progress*, 19: 1525-1536
- Dai YC, Yang ZL, Cui BK, Wu G, Yuan HS, Zhou LW, He SH, Ge ZW, Wu F, Wei YL, Yuan Y, Si J, 2021. Diversity and systematics of the important macrofungi in Chinese forests. *Mycosystema*, 40: 770-805 (in Chinese)
- Fang YW, Wang WB, He MX, Xu XJ, Gao F, Liu J, Yang TW, Cao Y, Yang T, Wang Y, Zhang CX, 2020. Relationship between the honeydew of mealy bugs and the growth of *Phlebopus portentosus*. *PLoS One*, 15(6): e0233710
- Fang YW, Wang WB, He MX, Xu XJ, Gao F, Yang TW, Liu J, Cao Y, Wang Y, Zhang CX, 2020. Investigation on host plants and scale insects species of fungus-insect gall of *Phlebopus portentosus* in Yunnan, Sichuan, and Guangxi Provinces. *Journal of Environmental Entomology*, 42(3): 684-694 (in Chinese)
- Fries N, Serck-Hanssen K, Dimberg LH, Theander O, 1987. Abietic acid, and activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). *Experimental Mycology*, 11(4): 360-363
- Gao F, He MX, Zhang CX, Liu J, Xu XJ, Cao Y, 2021a. Exploitation of SSR markers with high polymorphism from *Phlebopus portentosus*. *Tropical Agricultural Science & Technology*, 44(1): 24-28 (in Chinese)
- Gao F, Liu J, He MX, Fang YW, Yang TW, Wang Y, Cao Y, Zhang CX, 2021b. Population genetic structure analysis of *Phlebopus portentosus* mycelia isolated from fungus-insect galls. *Acta Edulis Fungi*, 2021(3): 27-38 (in Chinese)
- Giltrap NJ, 1981. Formation of primordia and immature fruiting bodies by ectomycorrhizal fungi in culture. *Transactions of the British Mycological Society*, 77: 204-205
- Hall IR, Lyon AJE, Wang Y, Sinclair L, 1998. Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 2. *Boletus edulis*. *Economic Botany*, 52(1): 44-56
- He MX, Cao Y, Zhang CX, Xu XJ, Liu J, Gao F, Wang WB, Fang YW, Yang TW, Tian YH, Wang Y, 2016a. A *Phlebopus portentosus* strain: China, CN106489528B. 2019-02-01 (in Chinese)
- He MX, Xu XJ, Yang TW, Liu J, Gao F, Fang YW, Wang WB, Zhang CX, Cao Y, Wang Y, 2019a. Effects of casing soil on mycelial and fruiting body growth of *Phlebopus portentosus*. *Edible Fungi of China*, 38(11): 37-41 (in Chinese)
- He MX, Yang TW, Gao F, Liu J, Xu XJ, Fang YW, Wang WB, Zhang CX, 2019b. Seasonal variation of fungus-insect gall and its correlation with fruiting of *Phlebopus portentosus*. *Acta Edulis Fungi*, 26(3): 73-81+2 (in Chinese)
- He MX, Zhang CX, Cao Y, Liu J, Ji KP, Wang WB, Gao F, Zhou M, Wu Y, Wang Y, 2012. A *Phlebopus portentosus* strain: China, CN102870597B. 2013-08-28 (in Chinese)
- He MX, Zhang CX, Cao Y, Liu J, Xu XJ, Gao F, Wang WB, Fang YW, Yang TW, Tian YH, Chen HY, Wang Y, 2016b. A *Phlebopus portentosus* strain PP003: China, CN106754397B. 2020-10-02 (in Chinese)
- He MX, Zhang CX, Ji KP, Cao Y, Liu J, Wang WB,

- 2009a. Optimization of selected physical and nutritional parameters affecting the growth of *Phlebopus portentosus* mycelium. *Acta Edulis Fungi*, 16(2): 41-44 (in Chinese)
- He MX, Zhang CX, Ji KP, Hou JY, Liu J, Wang WB, 2009b. Screening of carbon and nitrogen sources and inorganic salts mycelium culture medium of *Phlebopus portentosus*. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 24(5): 773-777 (in Chinese)
- He RY, 2018. Screening and preliminary function analysis of differentially expressed genes at three development stages of *Xerocomus spadiceus*. Master Thesis, Yunnan University, Kunming. 11-23 (in Chinese)
- Heinemann P, Rammeloo J, 1982. Observations sur le genre *Phlebopus* (Boletineae). *Mycotaxon*, 15: 384-404
- Hintz W, Anderson JB, Horgen PA, 1988. Nuclear migration and mitochondrial inheritance in the mushroom *Agaricus bitorquis*. *Genetics*, 119(1): 35-41
- Hu SH, Xiang T, Zhu ZG, 2017. A cultivation medium and method for *Phlebopus portentosus*: China, CN107162753B. 2020-08-11 (in Chinese)
- Huang FH, 2021. Zhenfeng county production base of *Phlebopus portentosus* formally put into production. *Guizhou Daily*, 2021-05-07(14) (in Chinese)
- Ji KP, Cao Y, He MX, Liu J, Zhang CX, Wang WB, 2009a. Artificial cultivation method for *Phlebopus portentosus*: China, CN101524035B. 2010-11-03 (in Chinese)
- Ji KP, Cao Y, Zhang CX, He MX, Liu J, Wang WB, Wang Y, 2011. Cultivation of *Phlebopus portentosus* in Southern China. *Mycological Progress*, 10(3): 293-300
- Ji KP, He MX, Wang WB, Zhang CX, Liu J, Cao Y, 2009b. A spawn culture method for *Phlebopus portentosus*: China, CN101491195B. 2010-11-03 (in Chinese)
- Ji KP, He MX, Wang WB, Zhang CX, Liu J, Liu CF, Cao Y, 2008. A liquid spawn culture method for *Phlebopus portentosus*: China, CN101381684B. 2011-04-13 (in Chinese)
- Ji KP, He MX, Zhang CX, Liu J, Wang WB, Hou JY, 2009c. Semi-artificial simulate cultivation of *Phlebopus portentosus* and the durability of hyphae on host roots. *Microbiology China*, 36(3): 377-382 (in Chinese)
- Ji KP, Ji GY, Luo SZ, Gao LX, Ji GY, Yang JQ, 2018a. A casing method for *Phlebopus portentosus* cultivation: China, CN109089730A. 2018-12-28 (in Chinese)
- Ji KP, Ji GY, Luo SZ, Ji GY, Gao LX, Fan CM, Wang QL, Chen JH, 2019. A domesticated *Phlebopus portentosus* strain HZ18006 and its SSR fingerprint: China, CN110423694A. 2019-11-08 (in Chinese)
- Ji KP, Ji GY, Luo SZ, Ji GY, Jin F, Huang HT, Xie F, 2017a. A cultivation method for *Phlebopus portentosus* and product *P. portentosus*: China, CN106900353B. 2020-12-04 (in Chinese)
- Ji KP, Ji GY, Luo SZ, Ji GY, Jin F, Xie F, Wei XL, Li CH, Zhang Q, Gao LX, 2017b. Preparation and application of medium for *Phlebopus portentosus*: China, CN108059517A. 2018-05-22 (in Chinese)
- Ji KP, Ji GY, Luo SZ, Ji GY, Wei XL, Li CH, Gao LX, 2018b. A soil spawn culture method for *Phlebopus portentosus*: China, CN109122051B. 2021-06-15 (in Chinese)
- Ji KP, Zhang CX, Zeng Y, Liu CF, He MX, Wang WB, 2007. Artificial fungal colony and its fruiting of *Phlebopus portentosus* (Boletaceae) in pot. *Acta Botanica Yunnanica*, 5: 554-558 (in Chinese)
- Jiang LL, Yang D, Cao Y, Wang PF, Zhang YR, Zhang KQ, Xu JP, Zhang Y, 2017. The complete mitochondrial genome of the edible basidiomycete mushroom *Phlebopus portentosus*. *Mitochondrial DNA Part B*, 2(2): 696-697
- Kaewnarin K, Suwannarach N, Kumla J, Choonpicharn S, Tanreuan K, Lumyong S, 2020. Characterization of polysaccharides from wild edible mushrooms from Thailand and their

- antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive activities. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 22(3): 221-233
- Kaewnarin K, Suwannarach N, Kumla J, Lumyong S, 2016. Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities. *Journal of Functional Foods*, 27: 352-364
- Karnchanatat A, Puthong S, Sihanonth P, Piapukiew J, Sangvanich P, 2013. Antioxidation and antiproliferation properties of polysaccharide-protein complex extracted from *Phaeogyroporus portentosus* (Berk. & Broome) McNabb. *African Journal of Microbiology Research*, 7(17): 1668-1680
- Kikuchi K, Matsushita N, Suzuki K, 2009. Fruit body formation of *Tylophilus castaneiceps* in pure culture. *Mycoscience*, 50: 313-316
- Kumla J, Bussaban B, Suwannarach N, Lumyong S, Danell E, 2012. Basidiome formation of an edible wild, putatively ectomycorrhizal fungus, *Phlebopus portentosus* without host plant. *Mycologia*, 104(3): 597-603
- Kumla J, Danell E, Bussaban B, Lumyong S, 2011. Suitable growth conditions and nutrition factors on *in vitro* culture of *Phlebopus portentosus* (Boletales). *Chiang Mai Journal of Science*, 38(1): 156-159
- Kumla J, Danell E, Lumyong S, 2015. Improvement of yield for a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, cultivation in northern Thailand. *Mycoscience*, 56(1): 114-117
- Kumla J, Hobbie EA, Suwannarach N, Lumyong S, 2016. The ectomycorrhizal status of a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, assessed using mycorrhizal synthesis and isotopic analysis. *Mycorrhiza*, 26: 333-343
- Kumla J, Suwannarach N, Lumyong S, 2020. A new report on edible tropical bolete, *Phlebopus spongiosus* in Thailand and its fruiting body formation without the need for a host plant. *Mycobiology*, 48(4): 263-275
- Liu J, Ji KP, Cao Y, Zhang CX, He MX, 2011. Selection of bacteria beneficial to the mycelial growth of *Phlebopus portentosus*. *Acta Edulis Fungi*, 18(2): 36-38 (in Chinese)
- Liu J, Yang TW, He MX, Fang YW, Xu XJ, Wang WB, Gao F, Zhang CX, 2020. Effects of different inoculation methods on fruiting of *Phlebopus portentosus* and host plant growth. *Acta Edulis Fungi*, 27(3): 45-51 (in Chinese)
- Liu JY, Liu XR, Deng YJ, Liu F, Xie BG, 2011. The application of the 'bidirectional haploid nuclei migration' in breeding and genetics of *Lentinula edodes*. *Mycosystema*, 30(5): 774-781 (in Chinese)
- Luo SZ, Ji GY, Ji GY, Huang HT, Jin F, Ji KP, 2017. Synthetic medium and main environmental conditions suitable for mycelium growth of *Phlebopus portentosus*. *Edible Fungi of China*, 36(5): 45-48+51 (in Chinese)
- Luo SZ, Ji KP, Ji GY, Ji GY, Gao LX, Fan CM, Wang QL, Chen JH, Wei XL, Li CH, 2019. A *Phlebopus portentosus* strain YL1701-2 and its SSR fingerprint: China, CN110423693B. 2021-08-13 (in Chinese)
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EGJ, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, *et al.* 68 authors, 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 452: 88-92
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, *et al.*, 51 authors, 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature*, 464(7291): 1033-1038
- McLaughlin DJ, 1970. Environmental control of fruit-body development in *Boletus rubinellus* in axenic culture. *Mycologia*, 62: 307-331
- Meotto F, Pellegrino S, Bounous G, 1999. Evolution of *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Pers. and *Boletus edulis* Bull.: Fr. synthetic ectomycorrhizae on

- European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) seedlings under field conditions. *Acta Horticulturae*, 494: 201-206
- Nelsen SF, 2010. Bluing components and other pigments of boletes. *Fungi*, 3: 11-14
- Ohta A, Fujiwara N, 2003. Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture. *Mycoscience*, 44: 295-300
- Sanmee R, Bernard D, Lumyong P, Izumori K, Lumyong S, 2003. Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand. *Food Chemistry*, 82: 527-532
- Sanmee R, Lumyong P, Dell B, Lumyong S, 2010. *In vitro* cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand. *Mycoscience*, 51(1): 15-22
- Sun ZC, Hu MG, Sun ZH, Zhu NL, Yang JS, Ma GX, Xu XD, 2018. Pyrrole alkaloids from the edible mushroom *Phlebopus portentosus* with their bioactive activities. *Molecules*, 23(5): 1198
- Tao L, Cao Y, Ji GY, Yan XB, Wang QL, Luo SZ, Ji GY, Gao LX, Ji KP, 2021. Effects of vitamin and growth regulator on the mycelial growth of *Phlebopus portentosus*. *Edible Fungi of China*, 40(6): 74-79 (in Chinese)
- Tao L, Ji GY, Yan LM, Ji GY, Luo SZ, Gao LX, Wang QL, Chen JH, Zhao F, Yu XL, Li H, Ji KP, 2019. A cap of cultivation bottle for casing. China, CN210746438U. 2020-06-16 (in Chinese)
- Thongklang N, Hyde KD, Bussaban B, Lumyong S, 2010. Culture condition, inoculum production and host response of a wild mushroom, *Phlebopus portentosus* strain CMUHH121-005. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 5(3): 413-425
- Wang WB, Cao Y, Ji KP, Liu J, Zhang CX, He MX, 2013. Effect of actinomycetes of casing on fruiting of *Phlebopus portentosus*. *Edible Fungi of China*, 32(2): 36-38 (in Chinese)
- Wang WB, Yang TW, Liu J, He MX, Fang YW, Zhang CX, 2019. Effects of different peat proportion on the fruiting of *Phlebopus portentosus*. *Tropical Agricultural Science & Technology*, 42(3): 34-36 (in Chinese)
- Watling R, 2001. The relationships and possible distributional patterns of boletes in South-East Asia. *Mycological Research*, 105(12): 1440-1448
- Wei XL, Zhang Q, Li CH, Gao LX, Luo SZ, Ji GY, Ji GY, Yu YX, 2018. A liquid spawn culture method and a cultivation method for *Phlebopus portentosus*: China, CN108934785B. 2021-03-05 (in Chinese)
- Wolfe BE, Tulloss RE, Pringle A, 2012. The irreversible loss of a decomposition pathway marks the single origin of an ectomycorrhizal symbiosis. *PLoS One*, 7: e39597
- Wu KY, Ji KP, Ji GY, Luo SZ, Wei XL, Li CH, Gao LX, 2018. A *Phlebopus portentosus* strain and domestication method: China, CN108934786B. 2021-03-05 (in Chinese)
- Wu Y, Liu J, Cao Y, He MX, Zhang CX, Wang WB, Ji KP, 2013. Effect of adding compound strains of bacteria and actinomycetes on fruit body growth of *Phlebopus portentosus*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 26(5): 1984-1987 (in Chinese)
- Xu XJ, Gao F, He MX, Zhang CX, Liu J, Fang YW, Wang WB, Yang TW, 2017. Green vegetable cultivation in substrate of *Phlebopus portentosus* dregs. *Tropical Agricultural Science & Technology*, 2017(3): 34-35 (in Chinese)
- Yamanaka K, Namba K, Tajiri A, 2000. Fruit body formation of *Boletus reticulatus* in pure culture. *Mycoscience*, 41(2): 189-191
- Yan L, Jiang SK, Xu R, Zhang GM, Fu JR, Zou JY, 2021. Research on composting of nature rubber latex serum and fungi residues. *Journal of Safety and Environment*, 2021(3): 1233-1239 (in Chinese)
- Yan XB, Cao Y, Ji GY, Tao L, Luo SZ, Gao LX, Ji GY, Wang QL, Ji KP, 2021. Effects of different amino acids on mycelial growth of *Phlebopus portentosus*. *Edible Fungi of China*, 40(6): 84-87 (in Chinese)
- Yang RH, Bao DP, Guo T, Li Y, Ji GY, Ji KP, Tan Q, 2019.

- Bacterial profiling and dynamic succession analysis of *Phlebopus portentosus* casing soil using MiSeq sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1927
- Yang RH, Li Y, Tang LH, Li CH, Bao DP, 2017. Genome-wide comparison of lignocellulose degradation enzymes in Agaricales. *Mycosystema*, 36(6): 705-717 (in Chinese)
- Yang TW, Liu J, Xu XJ, He MX, Gao F, Fang YW, Wang WB, Dai LM, Wang Y, Zhang CX, 2021. Sclerotia formation of *Phlebopus portentosus* in wild and artificial cultivation. PREPRINT (Version 1) available at Research Square, Doi: 10.21203/rs.3.rs-143126/v1
- Yang ZL, Zang M, 2003. Tropical affinities of higher fungi in southern China. *Acta Botanica Yunnanica*, 25(2): 129-144 (in Chinese)
- Ye LY, Meng GL, Song YJ, Hao JB, Liu XR, Wu XP, 2019. Effects of nuclear and mitochondrial genes on the mycelial growth, nutritional components and gene expression of *Pleurotus pulmonarius*. *Mycosystema*, 38(6): 851-862 (in Chinese)
- Ying GH, Lv ML, Li LL, Wang Y, Xue ZW, 2009. Study on the artificial cultivation of *Suillus luteus*. *Edible Fungi of China*, 28(5): 14-15 (in Chinese)
- Zang M, 2006. *Flora fungorum sinicorum* Vol. 22. Science Press, Beijing. 1-215 (in Chinese)
- Zhang BB, Zhang GZ, Fan LJ, Wang F, Qin XB, Xu Y, 2021. Molecular identification and selection of mother culture media of *Phlebopus portentosus*. *Journal of Biology*, 38(2): 61-64 (in Chinese)
- Zhang CX, He MX, Cao Y, Liu J, Gao F, Wang WB, Ji KP, Shao SC, Wang Y, 2015. Fungus-insect gall of *Phlebopus portentosus*. *Mycologia*, 107(1): 12-20
- Zhang CX, He MX, Cao Y, Liu J, Gao F, Xu XJ, Wang WB, Wang Y, 2016. Is *Phlebopus portentosus* an ectomycorrhizal mushroom?—on the mycorrhizal symbiosis of *P. portentosus* with pine and oak. *Acta Edulis Fungi*, 23(1): 37-41+2 (in Chinese)
- Zhang CX, He MX, Gao F, Liu J, Cao Y, Xu XJ, Wang WB, Wang Y, 2015a. Study on mycorrhizal synthesis of *Tuber indicum* with *Pinus kesiya* var. *langbianensis*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 28(1): 329-332 (in Chinese)
- Zhang CX, He MX, Ji KP, Cao Y, Liu J, Wang WB, 2009. Study on selection of mother culture media of *Phlebopus portentosus*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2009(6): 1699-1701 (in Chinese)
- Zhang CX, He MX, Liu J, Cao Y, Gao F, Xu XJ, Wang WB, Wang Y, 2015b. Preliminary studies on trophic relationships of *Phlebopus portentosus*, soil mealybug and plant. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 23(6): 359-363 (in Chinese)
- Zhang CX, He MX, Liu J, Cao Y, Wang WB, Wang Y, 2014. Nutritive components comparison of cultivated, semi-cultivated and wild *Phlebopus portentosus* fruit bodies. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 27(6): 2497-2500 (in Chinese)
- Zhang CX, Ji KP, He MX, Cao Y, Liu J, Wang WB, 2010. Analysis on nutrient components of *Phlebopus portentosus* fruit bodies. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 32(6): 702-704 (in Chinese)
- Zhang SR, Liu Q, Ji KP, 2014. Biological characteristics of *Crisicoccus matsumotoi* and its microhabitat fungus-insect gall. *Journal of Tianjin Normal University (Natural Science Edition)*, 34(2): 61-65 (in Chinese)
- Zheng H, 2017. A study on the development of wild edible fungi industry in Yunnan Province. Master Thesis, Yunnan Agricultural University, Kunming. 17-23 (in Chinese)
- Zheng R, Ji KP, Xie HF, Chai MH, 2020. A soil casing equipment for edible mushroom cultivation: China, CN213427434U. 2021-06-15 (in Chinese)
- Zhou QY, Li Y, 2020. Xishuangbanna branch agricultural developing bank of China fully support the development of *Phlebopus portentosus* industry. *Yunnan Economic Daily*, 2020-10-30(3) (in Chinese)
- Zou Y, Zheng QW, Chen X, Ye ZW, Wei T, Guo LQ, Lin JF, 2021. Physicochemical and emulsifying

properties of protein isolated from *Phlebopus portentosus*. LWT-Food Science and Technology, 142: 111042

[附中文参考文献]

曹旻, 2014. 云南省两种食用菌群体遗传学研究及暗褐网柄牛肝菌 (*Phlebopus portentosus*) 基因组学初步研究. 云南大学博士论文, 昆明. 64-77

曹旻, 方艺伟, 高峰, 何明霞, 张春霞, 许欣景, 王文兵, 王云, 2016. 暗褐网柄牛肝菌交配系统研究. 北方园艺, 24: 133-135

曹旻, 何明霞, 高峰, 刘静, 张春霞, 许欣景, 2017. 基于 SSR 标记的暗褐网柄牛肝菌遗传多样性分析. 北方园艺, 8: 111-114

曹旻, 纪开萍, 刘静, 张春霞, 何明霞, 王文兵, 2010. 瓶栽条件下覆土方法对暗褐网柄牛肝菌子实体生长的影响. 食用菌学报, 17(3): 29-32+91

曹旻, 纪开萍, 刘静, 张春霞, 何明霞, 王文兵, 2011. 不同覆土的性质及其对暗褐网柄牛肝菌人工栽培出菇的影响. 食用菌学报, 18(4): 25-27

曹旻, 徐建平, 张颖, 张春霞, 何明霞, 刘静, 高峰, 王文兵, 许欣景, 2015. 暗褐网柄牛肝菌 SSR 分子标记: 中国, CN104946763B. 2018-03-16

陈凤霞, 杨天伟, 李杰庆, 刘鸿高, 范茂攀, 王元忠, 2021. 云南牛肝菌不同部位三种重金属含量特征及风险评价. 食品工业科技, 42(12): 225-232

陈宇航, 陈政明, 林国华, 2002. 远东疣柄牛肝菌仿生栽培. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2002(4): 532-535

戴玉成, 杨祝良, 崔宝凯, 吴刚, 袁海生, 周丽伟, 何双辉, 葛再伟, 吴芳, 魏玉莲, 员瑗, 司静, 2021. 中国森林大型真菌重要类群多样性和系统学研究. 菌物学报, 40: 770-805

方艺伟, 王文兵, 何明霞, 许欣景, 高峰, 杨天伟, 刘静, 曹旻, 王云, 张春霞, 2020. 滇川桂 3 省暗褐网柄牛肝菌菌腔虫瘿的寄主植物与介壳虫种类调查. 环境昆虫学报, 42(3): 684-694

高峰, 何明霞, 张春霞, 刘静, 许欣景, 曹旻, 2021a. 暗褐网柄牛肝菌高多态性 SSR 标记的开发. 热带农业科技, 44(1): 24-28

高峰, 刘静, 何明霞, 方艺伟, 杨天伟, 王云, 曹旻, 张春霞, 2021b. 菌腔虫瘿中暗褐网柄牛肝菌菌丝体群体遗传结构分析. 食用菌学报, 2021(3): 27-38

何明霞, 曹旻, 张春霞, 许欣景, 刘静, 高峰, 王文兵, 方艺伟, 杨天伟, 田耀华, 王云, 2016a. 一株暗褐网柄牛肝菌菌株: 中国, CN106489528B. 2019-02-01

何明霞, 许欣景, 杨天伟, 刘静, 高峰, 方艺伟, 王文兵, 张春霞, 曹旻, 王云, 2019a. 覆土对人工栽培暗褐网柄牛肝菌菌丝及子实体生长的影响. 中国食用菌, 38(11): 37-41

何明霞, 杨天伟, 高峰, 刘静, 许欣景, 方艺伟, 王文兵, 张春霞, 2019b. 菌腔虫瘿的季节变化规律及其与暗褐网柄牛肝菌出菇的相关性. 食用菌学报, 26(3): 73-81+2

何明霞, 张春霞, 曹旻, 刘静, 纪开萍, 王文兵, 高峰, 周茂, 伍英, 王云, 2012. 一株暗褐网柄牛肝菌菌株: 中国, CN102870597B. 2013-08-28

何明霞, 张春霞, 曹旻, 刘静, 许欣景, 高峰, 王文兵, 方艺伟, 杨天伟, 田耀华, 陈海英, 王云, 2016b. 暗褐网柄牛肝菌 PP003 菌株: 中国, CN106754397B. 2020-10-02

何明霞, 张春霞, 纪开萍, 曹旻, 刘静, 王文兵, 2009a. 暗褐网柄牛肝菌菌丝的生物特性研究. 食用菌学报, 16(2): 41-44

何明霞, 张春霞, 纪开萍, 侯建勇, 刘静, 王文兵, 2009b. 暗褐网柄牛肝菌菌丝培养基的碳源、氮源及无机盐的筛选研究. 云南农业大学学报, 24(5): 773-777

和若瑜, 2018. 砖红绒盖牛肝菌三个发育阶段的差异表达基因筛选及其功能初步分析. 云南大学硕士论文, 昆明. 11-23

胡生华, 向婷, 朱志钢, 2017. 暗褐网柄牛肝菌的栽培培养基和方法: 中国, CN107162753B. 2020-08-11

黄飞鸿, 2021. 贞丰县 黑牛肝菌种植基地正式投产. 贵州日报, 2021-05-07(14)

纪开萍, 曹旻, 何明霞, 刘静, 张春霞, 王文兵, 2009a. 暗褐网柄牛肝菌人工栽培方法: 中国, CN101524035B. 2010-11-03

纪开萍, 何明霞, 王文兵, 张春霞, 刘静, 曹旻,

- 2009b. 暗褐网柄牛肝菌菌种的培养方法: 中国, CN101491195B. 2010-11-03
- 纪开萍, 何明霞, 王文兵, 张春霞, 刘静, 刘昌芬, 曹旸, 2008. 一种暗褐网柄牛肝菌液体菌种的培养方法: 中国, CN200810233469. 2011-04-13
- 纪开萍, 何明霞, 张春霞, 刘静, 王文兵, 侯建勇, 2009c. 暗褐网柄牛肝菌半人工模拟栽培及“宿主树”根系上菌丝生长的持久性. 微生物学通报, 36(3): 377-382
- 纪开萍, 纪光燕, 罗顺珍, 高丽霞, 纪光玉, 杨君巧, 2018a. 一种栽培黑牛肝菌覆土方法: 中国, CN109089730A. 2018-12-28
- 纪开萍, 纪光燕, 罗顺珍, 纪光玉, 高丽霞, 范春梦, 王秋兰, 陈建华, 2019. 一株人工驯化的暗褐网柄牛肝菌菌株 HZ18006 及其 SSR 标记指纹图谱: 中国, CN110423694A. 2019-11-08
- 纪开萍, 纪光燕, 罗顺珍, 纪光玉, 金福, 黄海涛, 谢飞, 2017a. 黑牛肝菌栽培方法以及黑牛肝菌: 中国, CN106900353B. 2020-12-04
- 纪开萍, 纪光燕, 罗顺珍, 纪光玉, 金福, 谢飞, 魏学林, 李春会, 张倩, 高丽霞, 2017b. 黑牛肝菌培养基及其制备方法和应用: 中国, CN108059517A. 2018-05-22
- 纪开萍, 纪光燕, 罗顺珍, 纪光玉, 魏学林, 李春会, 高丽霞, 2018b. 一种黑牛肝菌固体菌种的培养方法: 中国, CN109122051B. 2021-06-15
- 纪开萍, 张春霞, 曾雁, 刘昌芬, 何明霞, 王文兵, 2007. 盆栽条件下暗褐网柄牛肝菌人工菌塘及其子实体的培养. 云南植物研究, 5: 554-558
- 刘静, 纪开萍, 曹旸, 张春霞, 何明霞, 2011. 对暗褐网柄牛肝菌菌丝生长有益细菌的筛选. 食用菌学报, 18(2): 36-38
- 刘静, 杨天伟, 何明霞, 方艺伟, 许欣景, 王文兵, 高峰, 张春霞, 2020. 不同接种方法对暗褐网柄牛肝菌出菇及植物生长的影响. 食用菌学报, 27(3): 45-51
- 刘靖宇, 刘新锐, 邓优锦, 刘芳, 谢宝贵, 2011. 双向核迁移在香菇遗传和育种中的应用研究. 菌物学报, 30(5): 774-781
- 罗顺珍, 纪光玉, 纪光燕, 黄海涛, 金福, 纪开萍, 2017. 适宜暗褐网柄牛肝菌菌丝生长的合成培养基及主要环境条件. 中国食用菌, 36(5): 45-48+51
- 罗顺珍, 纪开萍, 纪光燕, 纪光玉, 高丽霞, 范春梦, 王秋兰, 陈建华, 2019. 一株暗褐网柄牛肝菌菌株 YL1701-2 及其 SSR 标记指纹图谱: 中国, CN110423693B. 2021-08-13
- 陶玲, 曹旸, 纪光燕, 晏汐蓓, 王秋兰, 罗顺珍, 纪光玉, 高丽霞, 纪开萍, 2021. 维生素及生长调节剂对黑牛肝菌菌丝生长的影响. 中国食用菌, 40(6): 74-79
- 陶玲, 纪光燕, 晏六妹, 纪光玉, 罗顺珍, 高丽霞, 王秋兰, 陈健华, 赵芳, 余潇龙, 李恒, 纪开萍, 2019. 一种瓶栽覆土盖: 中国, CN210746438U. 2020-06-16
- 王文兵, 曹旸, 纪开萍, 刘静, 张春霞, 何明霞, 2013. 覆土中放线菌对暗褐网柄牛肝菌出菇的影响. 中国食用菌, 32(2): 36-38
- 王文兵, 杨天伟, 刘静, 何明霞, 方艺伟, 张春霞, 2019. 不同草炭比例对覆土栽培暗褐网柄牛肝菌出菇的影响. 热带农业科技, 42(3): 34-36
- 魏学林, 张倩, 李春会, 高丽霞, 罗顺珍, 纪光燕, 纪光玉, 玉应香, 2018. 一种黑牛肝菌的液体菌种培养方法及栽培方法: 中国, CN108934785B. 2021-03-05
- 吴开云, 纪开萍, 纪光燕, 罗顺珍, 魏学林, 李春会, 高丽霞, 2018. 一株暗褐网柄牛肝菌菌株及其驯化方法: 中国, CN108934786B. 2021-03-05
- 伍英, 刘静, 曹旸, 何明霞, 张春霞, 王文兵, 纪开萍, 2013. 有益细菌及放线菌复合对暗褐网柄牛肝菌子实体生长的影响. 西南农业学报, 26(5): 1984-1987
- 许欣景, 高峰, 何明霞, 张春霞, 刘静, 方艺伟, 王文兵, 杨天伟, 2017. 暗褐网柄牛肝菌菌渣对青菜生长的影响. 热带农业科技, 2017(3): 34-35
- 岩利, 姜士宽, 徐荣, 张桂梅, 付稼榕, 邹建云, 2021. 天然橡胶乳清废水与菌渣堆肥的研究. 安全与环境学报, 2021(3): 1233-1239
- 晏汐蓓, 曹旸, 纪光燕, 陶玲, 罗顺珍, 高丽霞, 纪光玉, 王秋兰, 纪开萍, 2021. 不同氨基酸对黑牛肝菌菌丝生长的影响. 中国食用菌, 40(6): 84-87
- 杨瑞恒, 李燕, 唐利华, 李传华, 鲍大鹏, 2017.

- 基于全基因组数据解析伞菌目木质纤维素降解酶系的差异. 菌物学报, 36(6): 705-717
- 杨祝良, 臧穆, 2003. 中国南部高等真菌的热带亲缘. 云南植物研究, 25(2): 129-144
- 叶丽云, 孟国良, 宋燕娇, 郝金斌, 刘新锐, 吴小平, 2019. 核、质基因对肺形侧耳菌丝生长、营养成分及基因表达的影响. 菌物学报, 38(6): 851-862
- 应国华, 吕明亮, 李伶俐, 王益, 薛振文, 2009. 褐环粘盖牛肝菌人工栽培技术研究. 中国食用菌, 28(5): 14-15
- 臧穆, 2006. 中国真菌志第 22 卷. 北京: 科学出版社. 1-215
- 张冰冰, 张国珍, 樊莉娟, 王菲, 秦小波, 徐莺, 2021. 暗褐网柄牛肝菌的分子鉴定及母种培养基筛选. 生物学杂志, 38(2): 61-64
- 张春霞, 何明霞, 曹旻, 刘静, 高锋, 许欣景, 王文兵, 王云, 2016. 暗褐网柄牛肝菌是外生菌根菌吗?——暗褐网柄牛肝菌与思茅松和栲树的菌根合成. 食用菌学报, 23(1): 37-41+2
- 张春霞, 何明霞, 高锋, 刘静, 曹旻, 许欣景, 王文兵, 王云, 2015a. 印度块菌和思茅松菌根合成的研究. 西南农业学报, 28(1): 329-332
- 张春霞, 何明霞, 纪开萍, 曹旻, 刘静, 王文兵, 2009. 暗褐网柄牛肝菌母种培养基的筛选. 西南农业学报, 2009(6): 1699-1701
- 张春霞, 何明霞, 刘静, 曹旻, 高锋, 许欣景, 王文兵, 王云, 2015b. 暗褐网柄牛肝菌-植物-根粉蚧三者关系的初步研究. 食药菌, 23(6): 359-363
- 张春霞, 何明霞, 刘静, 曹旻, 王文兵, 王云, 2014. 暗褐网柄牛肝菌人工、半人工与野生子实体营养成分对比. 西南农业学报, 27(6): 2497-2500
- 张春霞, 纪开萍, 何明霞, 曹旻, 刘静, 王文兵, 2010. 暗褐网柄牛肝菌子实体营养成分分析. 云南大学学报 (自然科学版), 32(6): 702-704
- 张书蕊, 刘强, 纪开萍, 2014. 核桃皴粉蚧生物学特性及菌腔虫瘿的形成. 天津师范大学学报 (自然科学版), 34(2): 61-65
- 郑航, 2017. 云南省野生食用菌产业发展研究. 云南农业大学硕士学位论文, 昆明. 17-23
- 郑日, 纪开萍, 谢红飞, 柴明辉, 2020. 一种栽培食用菌的覆土设备: 中国, CN213427434U. 2021-06-15
- 周清翊, 李莹, 2020. 西双版纳州分行全力支持牛肝菌产业发展. 云南经济日报, 2020-10-30(3)

(本文责编: 韩丽)