

利用 SRAP 和 ISSR 建立快速鉴定灵芝属菌株的 SCAR 标记

许美燕^{1,2} 唐传红² 张劲松^{2*} 唐庆九² 杨焱² 贾薇² 潘迎捷³

¹南京农业大学微生物学系 南京 210095

²上海市农科院食用菌研究所 上海 201106

³上海水产大学 上海 200090

摘 要: 根据 ERIC 聚类分析的结果, 把 152 株灵芝属菌株 (包括 128 株来自中国的栽培菌株及 24 株国外菌株) 建成 48 个 DNA 池。用 SRAP 和 ISSR 引物对 48 个 DNA 池进行扩增, 筛选获得 4 个特异性标记, 回收特异性条带, 经克隆测序后设计了 4 对 SCAR 引物, 并通过 SCAR-PCR 扩增验证, 从而将 SRAP 标记和 ISSR 标记均成功地转化为特异性和稳定性更好的 SCAR 标记; 将得到的 4 个 SCAR 标记在构成 DNA 池的 152 个菌株上验证, 并建立多重 PCR 体系, 最终证实了 SCAR 特异标记在菌株快速检测鉴定中的可行性和可靠性。

关键词: DNA 池, 灵芝, 多重 PCR

Development of SCAR markers based on SRAP and ISSR for rapid identification of *Ganoderma* strains

XU Mei-Yan^{1,2} TANG Chuan-Hong² ZHANG Jing-Song^{2*} TANG Qin-Jiu² YANG Yan²
JIA Wei² PAN Ying-Jie³

¹Microbiology Department, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

²Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China

³Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China

Abstract: Forty-eight DNA pools were prepared using standardized DNA extracted from 152 *Ganoderma*

基金项目: 上海市农业科学院青年科技基金[No. 2006(06)]

*Corresponding author. E-mail: syja16@saas.sh.cn

收稿日期: 2007-11-20, 接受日期: 2008-01-03

isolates (128 Chinese isolates and 24 non-Chinese isolates) delineated on the basis of ERIC-PCR data. SRAP and ISSR methodologies were used to amplify DNA from the different pools, and four specific marker bands (one SRAP and three ISSR) were selected, cloned and sequenced. After conversion into more stable and more highly specific SCAR markers, a multiplex PCR system was developed and optimized using the corresponding SCAR primers. The feasibility and reliability of adopting strain-specific SCAR markers for the rapid identification of *Ganoderma* strains were confirmed.

Key words: DNA pool, *Ganoderma*, multiplex PCR

灵芝*Ganoderma lucidum*是一种重要的药用真菌。目前灵芝的生产用菌种比较混乱,而我国食用菌品种登记制度尚未完善,同种异名和异种同名的现象在栽培生产上非常普遍,这不仅给菌种的管理带来了难度,也给以灵芝为原料的保健品及药品等的相关产业造成了一定的经济损失(秦俊哲等 2005)。回顾过去30年间有关灵芝的药理作用及其有效成分的研究,都是以各国当地的灵芝为研究材料,同一学名所指的灵芝可能是不同的物种。对于其他科研单位来说,在相同学名的材料中寻找不到相同的活性成分时,将会造成混乱并影响研究结论,使得灵芝的基础科研与相关产业的发展面临许多困难(林志彬 2001)。因此,建立一种灵芝品种快速、准确的鉴定方法势在必行。

在灵芝科中,传统的分类鉴定主要依据子实体的形态学特征来进行,但是子实体的许多形态学特征往往随着生长条件的不同而发生变化,这给传统的分类学带来了很大的困难。随着分子生物学技术的发展,各种分子标记技术已广泛应用于品种鉴定。ISSR (inter-simple sequence repeats)技术是根据基因组内广泛存在的微卫星序列设计单一引物,对两侧具有反向排列SSR的一段DNA序列进行扩增;SRAP (Sequence related amplified polymorphism)是通过独特的引物设计对ORFs (Open Reading Frames)进行扩增,具有检测简单;重复性好;能够比较容易地分离目的标记并测序等。这两种标记均不需事先了解基因组序列信息,具有操作简便、快速、仅需微量DNA等特点,因而被广泛应用于遗传多样性研究(Davierwala *et al.* 2000; Ferriol *et al.* 2003)和种质资源的鉴定(Blair *et al.* 1999)。SCAR标记最早是在RAPD的基础上提出的。目前已经有将其他的分子标记如AFLP、ISSR等获得的物种的特异性条带转化为基因组特定位点扩增的共显性SCAR标记(Julio *et al.* 2006; Qin *et al.* 2006),但还没有利用SRAP技术转化为SCAR标记的报道。

与ISSR和SRAP相比,SCAR标记无需在样品鉴定时筛选大量的引物;也无需根据获得数据估算样品间的遗传相似性和构建遗传聚类图谱,因而在实际应用中,具有快速、简便和低成本的优越性。而且由于SCAR标记具有种甚至种内个体的特异性,并且在基因组上只代表一个位点,现已广泛应用于多个物种资源的诊断。在食用菌研究上,有用SCAR标记对香菇菌种进行鉴定的报道(Qin *et al.* 2006)。但SCAR标记在灵芝属菌株的鉴定上应用尚未见报道。

本研究以128株国内的栽培菌株及24株国外菌株为实验材料,利用ISSR-SCAR, SRAP-SCAR技术结合DNA池对灵芝属的菌株进行鉴定,并根据获得的SCAR标记建立多重

PCR体系，为SCAR分子标记推广应用于灵芝菌株的快速准确鉴定提供技术支持，同时也希望对我国菌种管理部门规范和清理我国现阶段管理混乱的菌种市场提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

供试菌株参见表 1，菌株编号所对应的菌株种名及来源参见唐传红的论文（唐传红 2004）。

表 1 供试菌株

Table 1 Strains

池编号	构成池的菌株数	菌株编号
Pool	Number of isolates	Isolates
C1	1	G0001
C2	1	G0042
C3	1	G0026
C4	1	G0014
C5	5	G0002, G0009, G0019, G0021, G0077
C6	10	G0003,G0004,G0006,G0007,G0010,G0013,G0016,G0017,G0025, G0027
C7	7	G0005,G0015,G0173,G0174,G0176,G0177,G0178
C8	30	G0008,G0018,G0040,G0041,G0044,G0047,G0048,G0049,G0052,G0054,G0062, G0066,G0067,G0068,G0069,G0070,G0071,G0072,G0073,G0074,G0075,G0076, G0079,G0080,G0082,G0083,G0084,G0085,G0086,G0088
C9	4	G0012,G0045,G0046,G0063
C10	1	G0059
C11	2	G0029,G0094
C12	12	G0089,G0090,G0097,G0098,G0099,G0100,G0103,G0106,G0108, G0112,G0115,G0116
C13	2	G0091,G0120
C14	2	G0101,G0109
C15	2	G0107,G0113
C16	5	G0030,G0032,G0033,G0034,G0035
C17	1	G0036
C18	1	G0037
C19	1	G0038
C20	1	G0011
C21	6	G0022,G0065,G0078,G0154,G0164,G0166
C22	16	G0146,G0150,G0151,G0152,G0153,G0157,G0158,G0161,G0162,G0163,G0167, G0169,G0170,G0171,G0172
C23	1	G0093

续表 1

C24	1	G0168
C25	2	G0023,G0024
C26	1	G0020
C27	1	G0104
C28	2	G0111,G0175
C29	2	G0092,G0096
C30	2	G0117,G0165
C31	2	G0130,G0139
C32	1	G0122
C33	1	G0123
C34	4	G0132,G0133,G0134,G0135
C35	5	G0140,G0141,G0143,G0144,G0145
C36	1	G0131
C37	1	G0138
C38	1	G0121
C39	1	G0142
C40	2	G0136,G0137
C41	1	G0081
C42	1	G0161
C43	1	G0128
C44	2	G0124,G0129
C45	1	G0126
C46	1	G0125
C47	1	G0095
C48	1	G0060

1.2 菌丝的培养和 DNA 的提取

将活化过的菌株接种到 PDB（马铃薯葡萄糖液体培养基）中，在 28℃、150r/min 条件下培养 10-15d，收集菌丝，采用改良的 LETS 法（Chen *et al.* 1999）提取基因组 DNA。分别用 1%的琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 DNA 的质量和浓度，并根据需要稀释至 10ng/μL。为了排除验证 SCAR 标记时可能存在的假阴性情况，对所有菌株待用的 DNA 进行 ITS 序列扩增（苏春丽等 2007）验证。

1.3 DNA 池的构建

根据本实验室用ERIC对152株灵芝属菌株（包括128株来自中国的栽培菌株及24株国外菌株）聚类分析的结果（唐传红 2004），把相似度水平在0.850以上的菌株构成一个DNA池，将同一个池内不同菌株的DNA按等量混合：池内只有一个菌株的DNA池，取10ng/μL

的DNA 100 μ L建成DNA池；池内有多个菌株的DNA池，则把构成同一DNA池的各个DNA样品各取10ng/ μ L的DNA 20 μ L混合，构建成DNA池。共建成48个DNA池。

1.4 SRAP反应

用SRAP引物对：me-3（forward）TGAGTCCAAACCGGAAT；em-13（reverse）GACTGCGTACGAATTGGT。反应体系及参数：扩增反应总体积25 μ L，由10 \times PCR buffer（Promega）2.5 μ L，25mmol/L MgCl₂（Promega）1.8 μ L，模板（10ng/ μ L）6.0 μ L，正反向引物（20 μ mol/L）各0.38 μ L，Taq酶（5U/ μ L）（Promega）0.3 μ L，10mmol/L dNTPs 0.5 μ L组成。每个管中加15 μ L的灭菌矿物油防止蒸发。对48个DNA池分别进行扩增，扩增反应在eppendorf公司的Authorized Thermal Cycler上进行，反应条件为94 $^{\circ}$ C 5min，前5个循环，94 $^{\circ}$ C 1min，37 $^{\circ}$ C 1min，72 $^{\circ}$ C 1min，后35个循环退火温度为52 $^{\circ}$ C，最后72 $^{\circ}$ C 10min。反应结束后，取8 μ L PCR产物于1.8%的Agarose凝胶上电泳，经EB染色后UV检测，拍照记录。

1.5 ISSR 反应

本实验利用ISSR引物(TTCCC)₃（Invitrogen公司合成）对48个池进行PCR分析。反应体系及参数：扩增反应总体积25 μ L，由10 \times PCR buffer（Promega）2.5 μ L，25mmol/L MgCl₂（Promega）2.0 μ L，模板（10 ng/ μ L）6.0 μ L，引物（20 μ mol/L）2 μ L，Taq酶（5U/ μ L）（Promega）0.25 μ L，10mmol/L dNTPs 0.5 μ L组成。PCR反应条件：94 $^{\circ}$ C 3min；94 $^{\circ}$ C 1min，46 $^{\circ}$ C 1min，72 $^{\circ}$ C 1min，40个循环；72 $^{\circ}$ C 5min。

1.6 SCAR 分析

从SRAP和ISSR扩增结果中，寻找各个DNA池的特异性条带，在紫外灯下切取目的条带，回收纯化后，用pGEM-Teasy（Promega）载体连接，转化于大肠杆菌（*E. coli*）DH5 α 感受态细胞中。测序由Invitrogen公司完成。根据测序的结果，通过软件primer premier 5.0分析设计特异引物（引物合成由Invitrogen公司完成）。

SCAR-PCR反应体系及参数：扩增反应总体积为25 μ L。各成分为10 \times PCR buffer（Promega）2.5 μ L，25mmol/L MgCl₂（Promega）1.5 μ L，模板（10ng/ μ L）5.0 μ L，正反向引物（20 μ mol/L）各0.5 μ L，Taq酶（5U/ μ L）（Promega）0.2 μ L，10mmol/L dNTPs 0.5 μ L。PCR反应条件：94 $^{\circ}$ C 3min；94 $^{\circ}$ C 1min，合适退火温度50s（不同的SCAR特异引物退火温度要求不同），72 $^{\circ}$ C 1min，30个循环；72 $^{\circ}$ C 10min。

1.7 SCAR 分子标记的验证

1.7.1 特异性验证：用在DNA池中获得的SCAR特异性标记，分别在构成池的各个菌株中扩增，验证其特异性。

1.7.2 灵敏度测试：在SCAR-PCR扩增中分别使用100pg、500pg、1ng、10ng、20ng、50ng的模板量，检验SCAR引物的灵敏度。

1.7.3 多重PCR的建立：为了在实际应用中能更高效，经济和简便的进行鉴定反应，本实验根据获得的4对SCAR引物建立多重PCR。反应参数同SCAR-PCR，反应体系中各种引物按相等的摩尔数分别添加。

2 结果与分析

2.1 ITS 通用引物检验 DNA 模板质量

用 ITS 通用引物 ITS1F/ITS4 对所有菌株进行扩增，验证 DNA 是否适合于 PCR 反应。结果 152 个菌株均能扩增出清晰的条带（图 1），说明所有待用的 DNA 是正常的，因此在后面的特异性 PCR 扩增反应中，如果某些菌株没有扩增产物，可以排除由于 DNA 不正常造成的假阴性的可能。

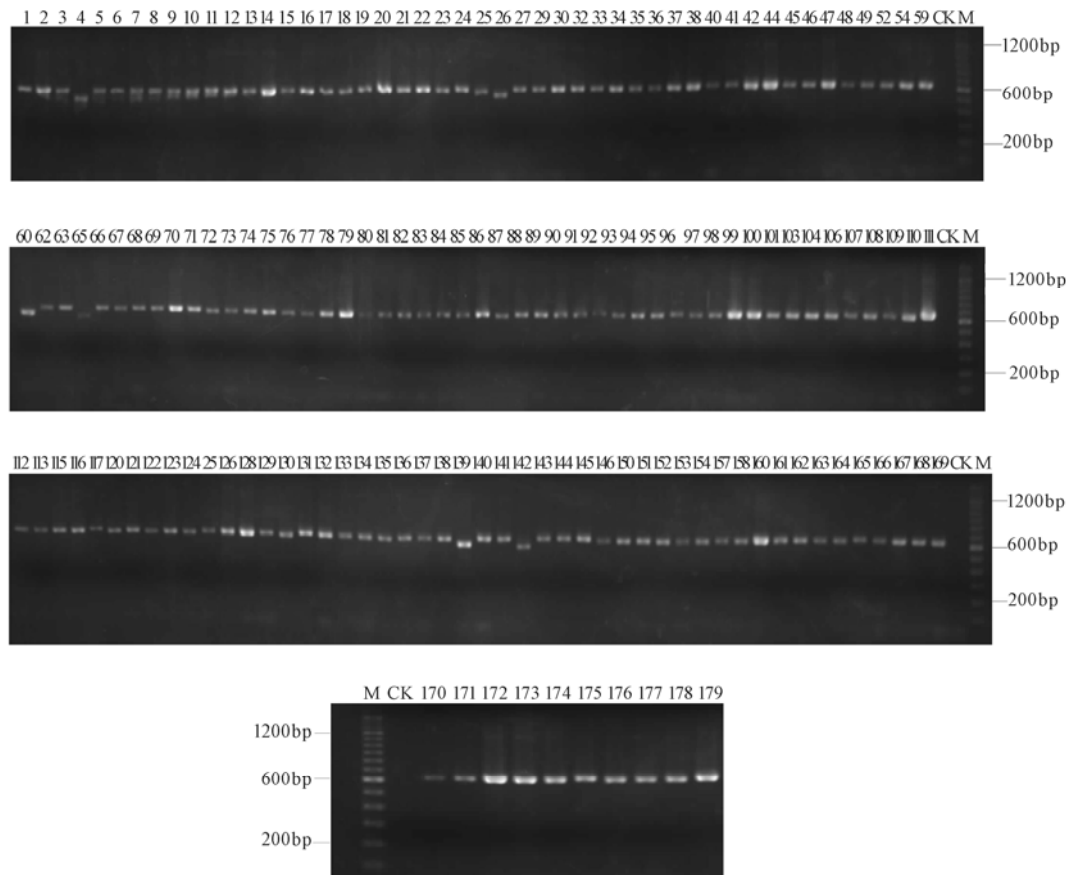


图 1 G001–G0179 菌株的 ITS 扩增图谱 M: 100bp DNA ladder; CK: 对照; 1-179: 菌株编号.
Fig. 1 ITS patterns of strains G001-G0179. M: 100bp DNA ladder; CK: Control; 1-179: Isolates of *Ganoderma*.

2.2 菌株特异性分子标记的获得

用SRAP和ISSR引物分别对 48 个DNA池进行PCR扩增，经筛选，发现SRAP的引物对 me3-em13 和ISSR引物(TTCCC)₃的重复性很好，且能稳定地扩增出特异的条带。其中引物对me3-em13 在C39 中扩增出 631bp 的特异条带（图 2），引物(TTCCC)₃在C4, 38 和C45 也分别扩出 876bp, 809bp和 1642bp的特异条带（图 3）。

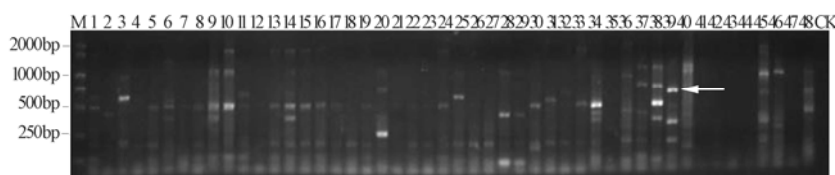


图 2 C39 在 SRAP 扩增图谱中的特异性条带 M: D2000 marker; CK: 对照; 1-48: DNA 池的编号; 箭头所指: SRAP 特异性标记。

Fig. 2 Specific SRAP bands linked with C39. M: D2000 marker; CK: Control; 1-48: Isolates of DNA pools; Arrows indicate specific SRAP marker.

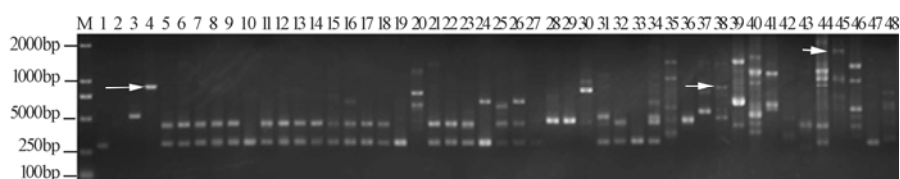


图 3 C4, C38 和 C45 在 ISSR 扩增图谱中的特异性条带 M: D2000 marker; 1-48: DNA 池的编号; 箭头所指: ISSR 特异性标记。

Fig. 3 Specific ISSR bands linked with C4, C38 and C45. M: D2000 marker, 1-48: Isolates of DNA pools; Arrows indicate specific ISSR marker.

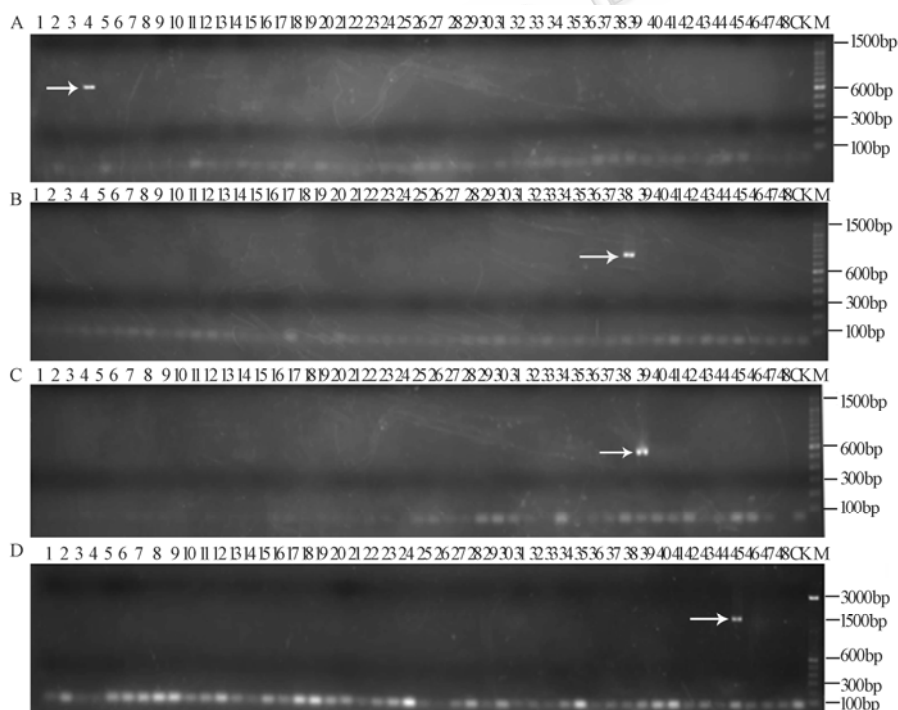


图 4 C4 (A), C38 (B), C39 (C) 和 C45 (D) 的 SCAR 扩增图谱 M: 100bp DNA ladder; CK: 对照; 1-48: DNA 池的编号; 箭头所指: SCAR 特异性标记。

Fig. 4 SCAR patterns of pools 4, 38, 39 and 45. M: 100bp DNA ladder; CK: Control; 1-48: Isolates of DNA pools; Arrows indicate specific SCAR marker.

2.3 SCAR 标记的建立

得到的 4 个特异性片段经回收纯化，克隆后测序。测序得到的序列用 Primer Premier 5.0 软件，设计获得 4 对特异引物，C4A/C4S，C38A/C38S，C39A/C39S，C45A/C45S。为了得到更稳定的引物和扩增结果，产物长度均略小于原来的特异片段，产物大小分别为 777bp，774bp，570bp 和 1572bp（图 4）。

2.4 SCAR 分子标记的验证

2.4.1 特异性验证：为了进一步验证获得的 SCAR 标记，了解其在灵芝菌株鉴定中的可行性和可靠性，用获得的四对引物对构成 DNA 池的 152 个菌株分别进行 SCAR 扩增。扩增结果显示：C4，C38，C39 和 C45 中获得的特异性 SCAR 标记在所有菌株中扩增都是只对应一个菌株，分别是 G0014，G0121，G0142 和 G0126，而在其他的菌株中均没有任何扩增结果。说明这四个标记都是针对单一菌株特异性的分子标记。

2.4.2 灵敏度测试：试验结果（图 5）表明，4 对 SCAR 引物的灵敏度都很高，仅 1ng 的 DNA 模板就能扩出清晰的目标条带。

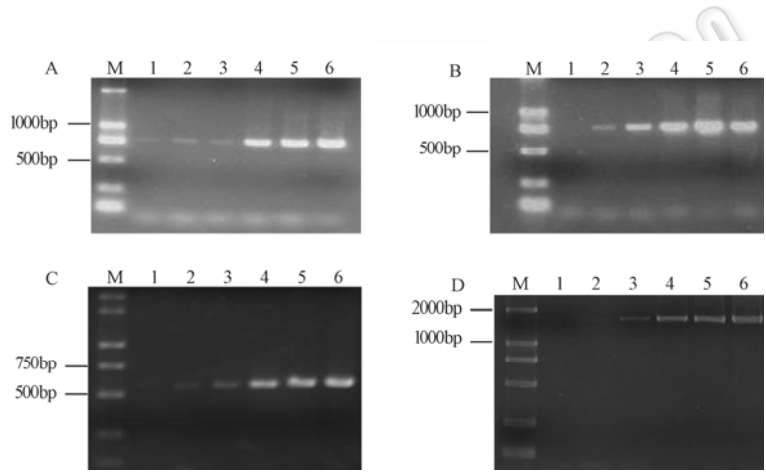


图 5 SCAR 引物 C4A/C4S (A)，C38A/C38S (B)，C39A/C39S (C) 和 C45A/C45S (D) 的梯度扩增图 M: D2000 marker; 1: 100pg; 2: 500pg; 3: 1ng; 4: 10ng; 5: 20ng; 6: 50ng.

Fig. 5 DNA fragments amplified by SCAR primer C4A/C4S, C38A/C38S, C39A/C39S and C45A/C45S. M: D2000 marker; 1: 100pg; 2: 500pg; 3: 1ng; 4: 10ng; 5: 20ng; 6: 50ng.

2.4.3 建立多重PCR：因筛选到的4个SCAR标记中，有两个标记C4（777bp）和C38（774bp）片段大小只相差3bp，在琼脂糖电泳时无法区分开来，因此利用4对SCAR引物中的3对PCR混合引物，分别建立了多重稳定PCR体系，泳道1和2分别扩出3个条带来，结果表明多重PCR是成功的（图6）。

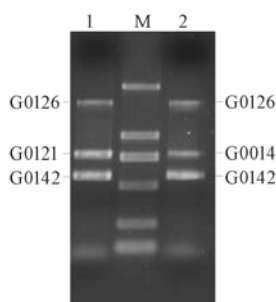


图 6 多重 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图 M: D2000 marker; 1: G0126-G0121-G0142 三联 PCR; 2: G0126-G0014-G0142 三联 PCR.

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR amplification products. M: D2000 marker; 1: G0126-G0121-G0142 multiplex PCR; 2: G0126-G0014-G0142 multiplex PCR.

3 讨论

DNA 池是指将具有某一共同特征群体的部分个体 DNA 提取后, 经过定量和稀释成一定浓度, 按一定的方式进行混合而构成的混合 DNA 样品 (童大跃和伍新尧 2000)。由于 152 个菌株无法在同一台 PCR 仪上同时进行扩增, 也无法在同一块胶上同时电泳, 因此很难比较筛选和获得特异的条带, 所以本试验根据 ERIC-PCR 技术对 152 株灵芝属菌株聚类分析的结果, 把相似水平在 0.850 以上的菌株构成一个 DNA 池, 共建成 48 个池。由于构成 DNA 池的菌株数目差异很大, 对于池内只有一个菌株的 DNA 池, 所有菌株可以同时扩增和电泳, 寻找和验证 SCAR 标记都比常规方法快速、高效; 而对于一个池内有十几个菌株的 DNA 池, 由于各个菌株之间亲缘关系非常接近, 通过 DNA 池找到的特异标记大多数是池内所有菌株共有的, 因此要寻找这种池内某个菌株的 SCAR 标记比较困难, 但是利用此法可以对 SCAR 标记进行快速验证, 可以大大节省时间和成本。

SRAP 是一种新的分子标记技术, Sun 等 (Sun *et al.* 2006) 首次将 SRAP 标记技术应用于灵芝菌株的分类研究, 但目前还没有利用 SRAP 技术寻找特异性分子标记的报道。本试验利用 SRAP 技术结合 DNA 池技术获得了一条特异片段, 并进一步将该特异的 SRAP 标记转化为稳定的 SCAR 标记, 该标记的获得即可作为 G0142 号菌株的特异 DNA 指纹而用于该菌株的准确鉴定。由此可见, 利用 SRAP 技术来获得灵芝菌株的特异 SCAR 标记, 为灵芝种质资源保护利用以及品种分类与鉴定提供了技术支持。

多重 PCR 就是在同一个反应管中同时完成多个不同基因扩增的 PCR 反应。这一方法最早报道于 1988 年 (Chamberlain *et al.* 1988), 已被成功地用于缺失分析 (Chamberlain *et al.* 1992; Henegariu *et al.* 1994), 突变 (Shuber *et al.* 1993) 与多态性 (Mutirangura *et al.* 1993), 以及定量分析 (Mansfield *et al.* 1993) 与反转录 PCR (Crisan 1994) 等多个 DNA 检测领域。本实验根据获得的 4 对 SCAR 引物建立多重 PCR。但因筛选到的 4 个 SCAR 标记中, 有两个标记 C4 (777bp) 和 C38 (774bp) 片段大小只相差 3bp, 琼脂糖电泳不能分开, 只

能利用 4 对 SCAR 引物中的 3 对, 分别建立多引物扩增反应体系, 实现同一个反应管同时检测和鉴定 3 个菌株, 即 G0126, G0014, G0142 和 G0126, G0121, G0142, 因此较单引物体系可节省大量的人力、物力, 大大降低成本。

[REFERENCES]

- Blair MW, Panaud O, McCouch SR, 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **98**: 780-792
- Chamberlain JS, Chamberlain JR, Fenwick RG, Ward PA, Caskey CT, Dimnik LS, 1992. Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by polymerase chain reaction. *The Journal of the American Medical Association*, **267**: 2609-2615
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Thomas C, 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, **16**(23): 11141-11156
- Chen X, Romaine CP, Ospina-Giraldo MD, Royse DJ, 1999. A polymerase chain reaction-based test for the identification of *Trichoderma harzianum* biotypes 2 and 4, responsible for the worldwide green mold epidemic in cultivated *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **52**: 246-250
- Crisan D, 1994. Molecular diagnostic testing for determination of myeloid lineage in acute leukemias. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, **24**: 355-363
- Davierwala AP, Chowdari KV, Kumar S, Reddy AP, Ranjekar PK, Gupta VS, 2000. Use of three different marker systems to estimate genetic diversity of Indian elite rice varieties. *Genetica*, **108**(3): 269-284
- Ferriol M, Picó B, Nuez F, 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**(2): 271-282
- Henegariu O, Hirschmann P, Kilian K, Kirsch S, Lengauer C, Maiwald R, Mielke K, Vogt P, 1994. Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia*, **26**(2): 97-106
- Julio E, Verrier JL, Dorlhac de Borne F, 2006. Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**: 335-346
- Lin ZB, 2001. Modern research of *Ganoderma*. Second edition. Beijing Medical University Press, Beijing. 1-327 (in Chinese)
- Mansfield ES, Robertson JM, Lebo RV, Lucero MY, Mayrand PE, Rappaport E, Parrella T, Sartore M, Surrey S, Fortina P, 1993. Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies. *American Journal of Medical Genetics*, **48**(4): 200-208
- Mutirangura A, Greenberg F, Butler MG, Malcolm S, Nicholls RD, Chakravarti A, Ledbetter DH, 1993. Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the *Prader-Willi/Angelman* critical region (15q11-q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Human Molecular Genetics*, **2**: 143-151
- Qin LH, Tan Q, Chen MJ, Pan YJ, 2006. Use of intersimple sequence repeats markers to develop strain-specific SCAR markers for *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, **257**(1): 112-116
- Qin JZ, Gu R, Chen H, 2005. Esterase isozyme analysis of 14 strains of *Ganoderma*. *Microbiology*, **32**(4): 20-24 (in Chinese)
- Shuber AP, Skoletsky J, Stern R, Handelin BL, 1993. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for

complex mutation analysis. *Human Molecular Genetics*, **2**: 153-158

Su CL, Tang CH, Zhang JS, Chen MJ, Pan YJ, 2007. The phylogenetic relationship of cultivated isolates of *Ganoderma* in China inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Acta Microbiologica Sinica*, **47**(1): 11-16 (in Chinese)

Sun SJ, Gao W, Lin SQ, Zhu J, Xie BG, Lin ZB, 2006. Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72**(3): 537-543

Tang CH, 2004. Study on genetic diversity of germplasm resources in cultivated *Ganoderma* in China. MS dissertation of Nanjing Agricultural University, Nanjing. 1-69 (in Chinese)

Tong DY, Wu XR, 2000. Study on the application of mix DNA pool. *International Journal of Laboratory Medicine*, **21**(2): 59-62 (in Chinese)

[附中文参考文献]

林志彬, 2001. 灵芝的现代研究. 第2版. 北京: 北京医科大学出版社. 1-327

秦俊哲, 谷睿, 陈合, 2005. 14个灵芝菌株的酯酶同工酶分析. 微生物学通报, **32**(4): 20-24

苏春丽, 唐传红, 张劲松, 陈明杰, 潘迎捷, 2007. 基于rDNA ITS序列探讨中国栽培灵芝菌株的亲缘关系. 微生物学报, **47**(1): 11-16

童大跃, 伍新尧, 2000. 混合DNA样品池应用的研究. 国外医学临床生物化学与检验学分册, **21**(2): 59-62

唐传红, 2004. 中国栽培灵芝资源的遗传多样性评价. 南京: 南京农业大学硕士学位论文. 1-69