

日本矶海绵共生真菌分离及其代谢产物 抑菌活性研究

Isolation and identification of symbiotic fungi from marine sponge *Reniera japonica* and the antimicrobial evaluation of its crude extract

柴家乐 白雪莲 郑双芝 卢甜甜

CHAI Jia-le BAI Xue-lian ZHENG Shuang-zhi LU Tian-tian

李晓菡 陈怡怡 吴丹丹

LI Xiao-han CHEN Yi-yi WU Dan-dan

(杭州师范大学生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310016)

(College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036, China)

摘要:以日本矶海绵作为试材,采用 3 种不同培养基利用涂布法以及划线法对其共生真菌进行分离。共分离到 33 株真菌,通过菌落形态、显微形态、生长规律观察并结合 rDNA ITS 序列分析,确定各菌株的种属,发现曲霉属和青霉属真菌为优势菌,其中 M3 是杂色曲霉。以致病菌大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)标准菌株为测试菌,采用 96 孔板法研究矶海绵共生真菌代谢产物的抑菌活性。结果表明,有 7 株共生真菌的次生代谢产物具有一定的抑菌活性,其中 M3 代谢产物对大肠杆菌的抑制作用最强,抑制率达 $(56.66 \pm 2.28)\%$,其次是 M1,抑制率为 $(51.23 \pm 6.24)\%$,二者均高于 100 mmol/L 青霉素。

关键词:海绵;共生真菌;抑菌活性

Abstract: Thirty-three fungal strains were isolated from the healthy tissue of marine sponge by three different media. They were identified by morphology characteristics analysis and rDNA ITS sequence analysis. The species of each strain was determined, and the dominant fungi of *Aspergillus* and *Penicillium* were found. Among them, M3 was *Aspergillus versicolor*. The antimicrobial activity of

the metabolites of the symbiotic fungi of marine sponge was studied by 96-well plate method with the standard strain of *Escherichia coli*. The results showed that the secondary metabolites of seven strains of symbiotic fungi had certain antimicrobial activity. The inhibition rate of M3 on *Escherichia coli* was $(56.66 \pm 2.28)\%$, followed by M1, with the inhibition rate was $(51.23 \pm 6.24)\%$. Both of them of higher than 100 mmol/L penicillin.

Keywords: Marine sponge; symbiotic fungi; antimicrobial activity

海绵具有特殊的滤食系统,可以使外界菌种在其体内和体表富集,成为共生真菌。海绵共生菌种属复杂,种类多样^[1-2]。海绵共生真菌长期生活在宿主体内的特殊环境中,并与宿主协同进化,在演化过程中二者形成了互惠共生的关系,因此可能产生与宿主相同或相似的活性次级代谢产物^[3-4]。国内外对植物共生真菌的研究报道^[5-6]较多,例如已利用紫杉共生真菌发酵生产紫杉醇,该物质为良好的抗肿瘤药物。但是对动物共生真菌的研究^[7-8]相对较少,关于海绵的就更少。孟庆鹏^[9]曾对海绵菌中可培养的共附生微生物进行研究,发现在 4 种海绵中有 85 株共生细菌,并对其功能基因进行了筛选,但未对其共生真菌进行研究。吴琦等^[10]对南海海绵共生真菌 *Emericellav variecolor* XSA-07-2 的代谢产物结构及活性进行研究,采用色谱分离技术共鉴定出 14 个新化合物,体外生物活性筛选试验表明,部分多烯 α 吡喃酮衍生物表现出抗流感病毒和抗肿瘤活性。Sou 等^[11]纯化获得 48 种海绵相关微生物,测定了各品种液体培养的乙酸乙酯提取物的细胞毒性、溶血活性和虾的致死活性。

近年来,致泻大肠埃希氏菌引起的食源性疾病日益受到人们的关注,其引发的出血性肠炎的暴发或散发性病例较为

基金项目:杭州市科技发展计划项目(编号:20170432B02);2018 年国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201810346034);2018 年浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(编号:2016R413053);“本科创新能力提升工程”项目(编号:cx2017101, cx2017119, cx2018134);2018 年杭州师范大学恒逸邱建林星光奖项目(编号:20180530223)

作者简介:柴家乐,男,杭州师范大学在读本科生。

通信作者:白雪莲(1978—),女,杭州师范大学讲师,博士。

E-mail: baixl2012@163.com

收稿日期:2018-07-02

常见,每年约有 2.8~4.0 亿例人源产肠毒素大肠杆菌感染发病,约造成 30~50 万人死亡^[12]。目前对大肠杆菌所引起的疾病多采用有效的抗生素进行治疗。抗生素的广泛持续使用和不当使用导致大肠杆菌耐药株的不断增多,使临床对大肠杆菌病的治疗变得十分困难,有时甚至找不到可治之药。鉴于此,本课题组以日本矶海绵为试材,采用 3 种培养基通过划线分离法进行共生真菌的分离,利用形态学观察结合分子生物学检测方法对其进行分类鉴定,以大肠杆菌为受试菌株,对分离获得的海绵共生菌的次级代谢产物进行抑菌活性研究,以期海绵资源的有效利用和大肠杆菌新的抑菌活性物质的开发提供新方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品的采集

日本矶海绵:采自大连星海湾,采样后立即装入采样袋于 4℃ 保藏运送至实验室进行试验。

1.1.2 试剂

海水配制:将氯化钠 26.518 g、氯化镁 2.447 g、硫酸镁 3.305 g、氯化钙 1.141 g、氯化钾 0.725 g、碳酸氢钠 0.202 g、溴化钠 0.083 g 分别溶解至蒸馏水中,混合,定容至 1 000 mL^[13];

培养基:马铃薯葡萄糖肉汤固体培养基(PDA 培养基)、马丁培养基、营养肉汁琼脂培养基、牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(BYP);

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* 1.2812):中国微生物菌种保藏中心。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 将冷冻保藏的样品进行自然解冻,去除杂质,用无菌水对海绵表面进行反复清洗 3~5 次。将最后 1 次清洗液涂布于 PDA 培养基上,28℃ 恒温培养 3 d,观察是否长菌,如未长菌即可开展后续试验。

1.2.2 日本矶海绵共生真菌分离 用无菌剪将海绵组织剪成小块,置于 100 mL 无菌水中充分震荡,静置 5 min,吸取 200 μL 上述溶液分别涂布于 PDA 培养基(蒸馏水配制)、PDA 培养基(海水配制)、马丁培养基(海水配制)上,静置,使溶液渗入培养基中,倒置于恒温培养箱中 28℃ 培养,观察菌落生长情况。待形成明显菌落的时候,利用划线分离法进行分离,直至获得单一菌种。

1.2.3 共生真菌形态学观察

(1) 菌落形态观察:将分离得到的菌种,采用点植法接种于其对应的培养基上,28℃ 恒温培养。每天观察和记录菌落生长状况,拍摄菌落图片。

(2) 共生真菌显微形态观察:将菌株通过划线分离法接种于培养基上,垂直于划线方向,用无菌镊子将灭菌后的盖玻片斜插入培养基中,将培养皿于 28℃ 恒温培养,直至菌丝长至盖玻片约 1/2 处,取出盖玻片,放在滴有无菌水的载玻片上,观察矶海绵共生真菌的显微形态。

1.2.4 共生真菌分子生物学鉴定 将分离的纯菌种送至上海桑尼生物有限公司进行 rDNA ITS 测序,首先提取 DNA,

然后进行 PCR 扩增,引物设计见表 1,PCR 扩增反应体系见表 2,在 PCR 扩增仪上进行 PCR 反应,反应程序为预变性:95℃,5 min;变性:95℃,30 s;退火:58℃,30 s;延伸:72℃,1 min;终延伸:72℃,7 min;循环数:35。反应完成后,取 3 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。确认 PCR 扩增片段。取各个菌种纯化后的 PCR 产物,使用测序仪进行 DNA 测序。最后进行序列分析,利用 BLAST 搜索软件将测序结果与 GenBank 数据库中相关真菌菌株的序列进行比对,获得相似性序列,再用 DNAMA9.0 软件进行邻接法(Neighbor Joining)聚类系统发育分析,从而确定菌种的分类地位。

表 1 引物设计
Table 1 Primer design

引物名称	序列
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

表 2 PCR 扩增反应体系
Table 2 PCR amplification reaction system

试剂	体积/μL
基因组 DNA(20 ng/μL)	1.0
10×Buffer(含 2.5 mmol/L Mg ²⁺)	5.0
Taq 聚合酶(5 U/μL)	1.0
ITS1(10 μmol/L)	1.5
ITS4(10 μmol/L)	1.5
dNTP(10 mmol/L)	1.0
ddH ₂ O	39.0
总体积	50.0

结合菌落形态、显微形态、分子鉴定结果,参照文献^[14]确定菌株的分类学地位。

1.2.5 共生真菌代谢产物的抑菌活性研究

(1) 共生真菌代谢产物制备:将各菌株接种于 2 L 与其对应的液体培养基中,28℃,100 r/min 条件下,恒温培养 7~14 d。发酵液离心(8 000 r/min,10 min),收集上清液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,将乙酸乙酯合并后减压浓缩至干,称重,用二甲基亚砜(DMSO)溶解备用。

(2) 抑菌活性测定:以大肠埃希氏菌为测试菌株,用 BYP 培养液在 37℃ 恒温摇床上培养 3 d。采用血球计数板计数,当菌悬液中细菌浓度为 1×10⁵ 个/mL 时采用 96 孔板微量法测定抑菌活性。试验组每孔加入 90 μL 菌悬液(1×10⁵ 个/mL),加入 10 μL 代谢产物溶液(DMSO 为溶剂,按照 3.5.1 制备),5 孔为一组,做 2 组平行。以 DMSO 为阴性对照,以 100 mmol/L 青霉素溶液为阳性对照。加样完成后,在 37℃,100 r/min 条件下,置于恒温摇床中培养。以 12 h 作为一个测定周期,在 600 nm 波长下测定 OD 值。按式(1)计算抑制率。

$$c = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100\%,$$

(1)

式中:

c ——抑制率,%;
 OD_1 ——阴性对照组吸光值;
 OD_2 ——试验组吸光值。

1.3 数据处理

所有数据均以 3 个独立样本的 $\bar{x} \pm SEM$ 表示。采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,数据进行方差分析后,用 Student's t 检验进行 2 组之间的比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 日本砗海绵共生真菌的分离与鉴定

从日本砗海绵中共分离到 33 株共生真菌,其中采用 PDA 培养基(蒸馏水)分离到 21 株,PDA 培养基(海水)分离到 7 株,马丁培养基(海水)分离到 5 株。通过对各菌种的菌落形态观察、显微形态观察以及分子生物学鉴定结果分析可知,砗海绵共生真菌分别属于 4 个属:青霉属、曲霉属、丝衣霉属、红酵母属。其中 L18、L19 属于青霉属,P7 属于红酵母属,L2、L15 未能确定其菌种分类地位。具体情况如表 3 所示。

由表 4 可知,青霉属和曲霉属的真菌是海绵共生菌的优势菌,二者分离频率之和达 87.9%,其中 M1 呈现典型的青霉菌的菌落形态特征,菌落呈绿色,生长速度快,菌落致密,

表 3 不同培养基共生真菌分离情况
Table 3 Symbiotic fungi on the different medium

培养基	属	株数
PDA 培养基 (蒸馏水)	青霉属	8
	曲霉属	11
	丝衣霉属	2
PDA 培养基 (海水)	青霉属	2
	曲霉属	3
	红酵母属	1
马丁培养基 (海水)	丝衣霉属	1
	青霉属	2
	曲霉属	3

与 L9 菌落形态相似,但菌落背面呈橙色,具体种属还需进一步鉴定。M4 等 8 株菌为曲霉属,菌丝向空中不断伸长,生长速度也较快,有些呈黄色,有些呈白色。海绵共生真菌种类多,具有微生物多样性的特点。典型海绵共生真菌菌落图片和显微形态见图 1、2。

2.2 分子生物学鉴定及聚类分析

将共生真菌测序结果输入 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,将有最高比对的菌株及匹配编号列于表 5 中。共生

表 4 共生真菌形态特征
Table 4 Morphological characteristics of Symbiotic fungi

属	代表菌株	主要特征记录	株数	分离频率/%
青霉属	L1、L18、L19、P1、P3、M1、M5	菌丝初为白色,渐变为绿色、墨绿色,边缘带有一圈白色菌丝,生长较为致密,为绿色粉末孢子,正反面颜色不同,背面呈现橙色,有些背面无颜色	12	36.4
曲霉属	L4、L6、L14、P4、P5、M2、M3、M4	匍匐于基质并且菌丝呈现向空中伸出球形或椭圆形顶囊的分生孢子梗,在培养基生长较快,表面有放射状沟纹	17	51.5
丝衣霉属	L7、L8、P6	菌落表面呈细丝状,生长均匀,表面为土黄色,生长速度较快。	3	9.1
酵母属	P7	菌落表面湿润呈黏质状,表面为红色生长速度较慢	1	3.0

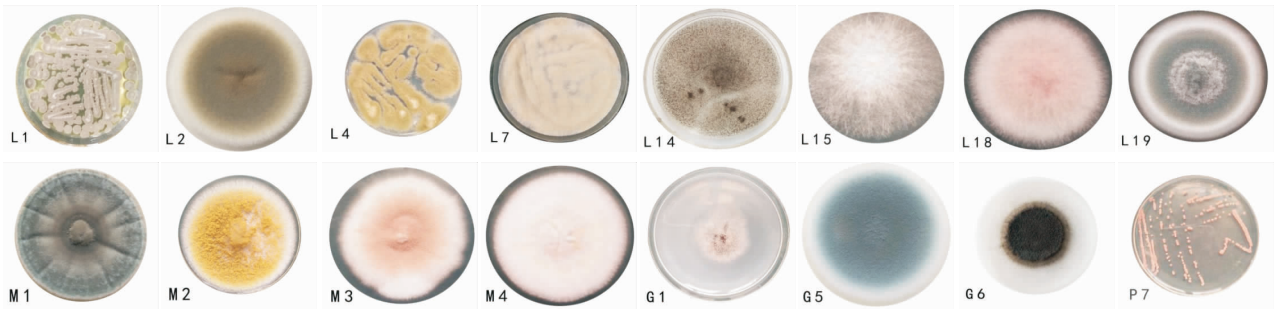


图 1 部分共生真菌菌落形态特征
Figure 1 Colony morphological characteristics of parts of fungi

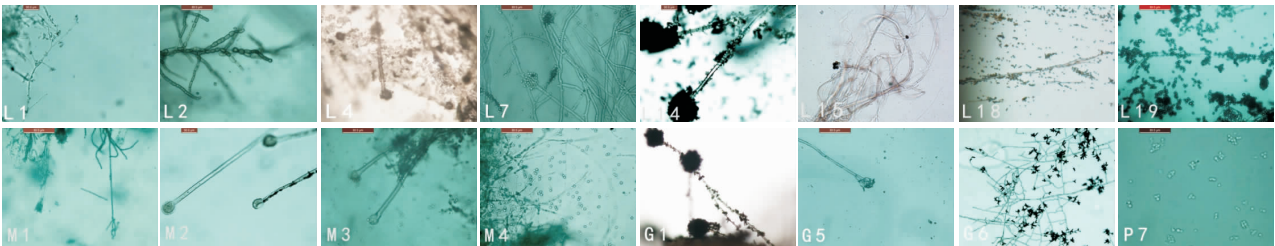


图 2 部分共生真菌显微形态(放大倍数均为 400 倍)
Figure 2 Microscopic morphological characteristics of parts of fungi($\times 400$)

真菌序列与比对后获得相似度较高的菌株序列,录入 DNA-MA9.0 软件进行聚类分析,采用邻接法(Neighbor Joining)构建系统发育树。结果表明,共生真菌分为 4 个属:青霉属、曲霉属、酵母属、丝衣霉属。据菌落形态特征和显微形态特征及聚类分析可知,L1 是桔青霉,M3 是杂色曲霉。其中 L2、L15、L18、L19、P7 与 NCBI 数据库中的菌种的序列同源性<50%,不能确定其种属。

2.3 共生真菌的抑菌活性

采用 96 孔板法测定各菌株代谢产物的抑菌活性,发现 L2、L7、M1、M3、M4、P7 对于大肠埃希氏菌表现出一定的抑制效果(见表 6)。

从表 6 可知,33 株海绵共生真菌中有 7 株具有抑菌活性。本试验以 12 h 为检测周期,培养 24 h 后有 7 株共生真菌次生代谢产物有一定的抑菌活性,其中 M3 对大肠杆菌的抑制作用最强,抑制率达(56.66±2.28)%,其次是 M1,抑制率为(51.23±6.24)%,二者均高于阳性对照。共生真菌 M4 的抑制率随时间延长而增强,48 h 达最强,为(41.69±6.33)%。其它菌抑菌活性未呈时间依赖性。

3 结论

试验共分离获得 33 株海绵共生真菌,分子鉴定结合形态观察确定青霉属和曲霉属真菌为海绵共生真菌的优势菌。

表 5 NCBI 数据库匹配结果
Table 5 NCBI database matching results

培养基	菌株编号	最相近菌株	序列同源性/%	NCBI 匹配编号
PDA 培养基 (蒸馏水)	L1	<i>Penicillium citrinum</i>	100	KC960012.1
		<i>Aspergillus flavus</i>	100	GU953210.1
		<i>Aspergillus nomius</i>	100	AB008404.1
	L4	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	XR_002735719.1
		<i>Aspergillus parasiticus</i>	100	D63699.1
		<i>Aspergillus tamarii</i>	100	AB106338.1
	L7	<i>Byssochlamys nivea</i>	100	M83256.1
		<i>Byssochlamys spectabilis</i>	100	AB023948.1
		<i>Paecilomyces variotii</i>	100	JF416647.1
	L14	<i>Aspergillus awamori</i>	100	KF922319.1
		<i>Aspergillus niger</i>	100	JX112703.1
马丁培养基 (海水)	M1	<i>Uncultured Dikarya</i>	99	HQ191325.1
		<i>Aspergillus flavus</i>	100	AF548060.1
		<i>Aspergillus oryzae</i>	100	AP007173.1
	M2	<i>Aspergillus parasiticus</i>	100	D63699.1
		<i>Aspergillus tamarii</i>	100	AB106338.1
		<i>Aspergillus versicolor</i>	100	GU227343.1
	M4	<i>Aspergillus niger</i>	99	AM270052.1
		<i>Penicillium camemberti</i>	100	GQ458039.1
	M5	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	KX580630.1
		<i>Penicillium expansum</i>	100	AB028137.1

表 6 各菌种次生代谢产物对大肠埃希氏菌的抑制效果[†]
Table 6 Strains of the secondary metabolites of e. coli bacteria inhibition effect

菌株	抑制率/%			
	12 h	24 h	36 h	48 h
P7	—	30.18±4.91 ^b	21.11±3.49 ^c	38.39±4.56 ^a
M1	—	51.23±6.24 ^a	48.60±6.49 ^{ab}	40.09±5.54 ^b
M3	—	56.66±2.28 ^a	54.19±4.00 ^a	56.26±3.74 ^a
M4	—	32.49±8.78 ^a	41.35±5.86 ^a	41.69±6.33 ^a
M5	—	26.15±3.22	21.21±11.78	—
L2	—	30.21±2.58 ^a	33.69±0.25 ^a	20.73±1.84 ^b
L7	—	40.33±8.32 ^a	17.97±6.22 ^a	10.36±5.06 ^a
阳性对照	11.87±4.30 ^c	31.13±8.19 ^b	42.87±5.52 ^a	46.13±3.29 ^a

[†] “—”表示无抑制作用;同行不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

类较多,本研究仅针对 x 方向横截面为矩形的体驱动器,截面为椭圆形或半圆形的驱动器需要根据其几何模型进行相应的建模研究。

参考文献

[1] 肖艳. 机器人在包装自动化领域发展势头强劲[J]. 中国包装工业, 2014(13): 16-22.

[2] FILIP I, AARON D M, GEORGE M W, et al. Soft robotics for chemists[J]. Angewandte Chemie, 2011, 123(8): 1 930-1 935.

[3] 张润玺, 王贺升, 陈卫东. 仿章鱼软体机器人形状控制[J]. 机器人, 2016, 38(6): 754-759.

[4] 王田苗, 郝雨飞, 杨兴帮, 等. 软体机器人: 结构、驱动、传感与控制[J]. 机械工程学报, 2017, 53(13): 1-13.

[5] DANIELA R, MICHAEL T T. Design, fabrication and control of soft robots[J]. Nature, 2015, 521(7 553): 467-475.

[6] PANAGIOTIS P, WANG Zheng, KEVIN C G, et al. Soft robotic glove for combined assistance and at-home rehabilitation[J]. Robotics and Autonomous Systems, 2015, 73: 135-143.

[7] HAO Yu-fei, WANG Tian-miao, WEN Li, et al. Universal soft pneumatic robotic gripper with variable effective length[C]// Proceedings of the 35th Chinese Control Conference. Piscataway: IEEE, 2016: 6 109-6 114.

[8] ZHANG Jin-hua, WANG Hao, TANG Jia-qing, et al. Modeling and design of a soft pneumatic finger for hand rehabilitation[C]// Proceeding of the 2015 IEEE International Conference on Infor-

mation and Automation. New York: IEEE, 2015: 2 460-2 465.

[9] 王华, 康荣杰, 王兴坚, 等. 软体弯曲驱动器设计与建模[J]. 北京航空航天大学学报, 2017, 43(5): 1 053-1 060.

[10] PANAGIOTIS P, WANG Zheng, JOHANNES T B, et al. Modeling of soft fiber-reinforced bending actuators[J]. IEEE Transactions on Robotics, 2015, 31(3): 778-789.

[11] FIONNUALA C, CONOR J W, KATIA B. Automatic design of fiber-reinforced soft actuators for trajectory matching[J]. PNAS, 2017, 114(1): 51-56.

[12] 魏树军, 王天宇, 谷国迎. 基于纤维增强型驱动器的气动软体抓手设计[J]. 机械工程学报, 2017, 53(13): 29-38.

[13] BOBAK M, CONOR J W, GEORGE M W, et al. Pneumatic networks for soft robotics that actuate rapidly [J]. Advanced Functional Materials, 2014, 24(15): 2 163-2 170.

[14] ALI Z, ABBAS Z K, SUI Y K, et al. Evolution of 3D printed soft actuators[J]. Sensors and Actuators A: Physical, 2016, 250: 258-272.

[15] 李雪冰, 危银涛. 一种改进的 Yeoh 超弹性材料本构模型[J]. 工程力学, 2016, 33(12): 754-759.

[16] CHRISTINE R, JEAN-MICHEL C, FENG Zhi-qiang, et al. The Yeoh model applied to the modeling of large deformation contact/impact problems[J]. International Journal of Impact Engineering, 2009, 36(5): 659-666.

[17] MARCIN G, RADOŚŁAW S, STANISŁAW J. Modelling of elastomeric bearings with application of Yeoh hyperelastic material model[J]. Procedia Engineering, 2015, 111: 220-227.

(上接第 78 页)

其中 L1 是桔青霉, M3 是杂色曲霉。针对大肠埃希氏菌进行抑菌活性试验发现, M3 等 7 株共生真菌代谢产物抑菌活性强, 具有良好的研究潜质。今后还将利用色谱技术分离和鉴定其化学组成和分子结构, 为开发新的抑菌活性物质提供新化合物。此外, 试验共分离获得 33 株海绵共生真菌, 菌株数量有限, 后续试验还可以通过增加分离培养基种类等方法, 进一步挖掘海绵共生真菌资源。

参考文献

[1] 谢俊. 高通量组学方法在海绵共生微生物研究中的应用[D]. 上海: 上海交通大学, 2015: 10-15.

[2] LI Zhi-yong, WANG Yue-zhu, LI Jin-long, et al. Metagenomic analysis of genes Encoding nutrient cycling pathways in the microbiota of deep-sea and shallow-water sponges[J]. Marine Biotechnology, 2016, 18(6): 659-671.

[3] KIKUCHI S, OKADA K. Isolation and structure determination of lysiformine from bacteria associated with marine sponge Halichondria okadai[J]. Tetrahedron, 2018, 74(27): 3 742-3 747.

[4] LIU Juan, LIU Yong-hong. Antimicrobial compounds from marine invertebrates-derived microorganisms[J]. Current Medicinal Chemistry, 2016, 23(25): 2 892-2 905.

[5] 张连娟, 沙本才, 龙光强, 等. 药用植物与微生物互利共生关系的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(10):

1 750-1 757.

[6] 李媛, 李振宇. 天然抗癌药物—紫杉醇[J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学、医学版, 2006(4): 58-62.

[7] 汪福源, 顾觉奋, 高向东, 等. 动物内生真菌研究进展[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2017, 38(2): 58-61.

[8] 蒲红宇, 张弼, 唐玲. 海绵的生物学特性及其在水产养殖中的应用前景[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(3): 135-138.

[9] 孟庆鹏. 可培养海绵共附生微生物 PKS 和 SOD 功能基因的筛选[M]. 上海: 上海交通大学, 2007: 28-30.

[10] 吴琦, 林文翰. 中国南海海绵共生真菌 Emericella varicolor XSA-07-2 活性聚酮类代谢产物的研究[C]// 中国药学会. 2014 年中国药学会大会暨第十四届中国药师周论文集. [出版地不详]: 中国药学会, 2014: 2.

[11] SOU Kikuchi, KAYO Okada, YUKO Cho, et al. Isolation and structure determination of lysiformine from bacteria associated with marine sponge Halichondria okadai [J]. Tetrahedron, 2018, 74: 3 742-3 747.

[12] WHO. Future directions for research on enterotoxigenic Escherichia coli vaccines for developing countries[J]. Weekly Epidemiological Record, 2006, 81(11): 97-104.

[13] 湛江水产专科学校. 海洋饵料生物培养[M]. 北京: 农业出版社, 1980: 89-92.

[14] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 198-200.