

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.02.008

顾福根, 孙丙耀, 苏国兴, 等. 长叶皇冠的组织培养与快速繁殖技术研究 [J]. 广西植物, 2013, 33(2): 181–184

Gu FG, Sun BY, Su GX, et al. Studies on tissue culture and rapid propagation technique of *Echinodorus subalatus* [J]. Guihaia, 2013, 33(2): 181–184

长叶皇冠的组织培养与快速繁殖技术研究

顾福根*, 孙丙耀, 苏国兴, 姜亚博, 周烽明, 陈梦菲

(苏州大学 医学部, 苏州 215123)

摘要: 以长叶皇冠短缩茎为外植体进行离体培养, 对外植体灭菌方法以及培养基中不同种类和浓度生长调节剂对增殖、生根的影响等进行研究。结果表明: 以 0.1% 的 HgCl_2 为灭菌剂, 采用 8 min + (6~8) min、间歇时间为 24 h 的间歇灭菌法, 可获得 20% 以上的成活无菌外植体; 试管苗茎纵切成 4 份后, 接种在 $1/2\text{MS} + 6\text{-BA } 6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增殖培养基上培养 42 d, 增殖系数可达 9.3; 在 $1/2\text{MS} + \text{NAA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上培养 28 d 后, 生根率达 100%, 平均每株约生根 18 条; 炼苗后移植成活率 100%。

关键词: 长叶皇冠; 短缩茎; 组织培养; 间歇灭菌

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2013)02-0181-04

* Studies on tissue culture and rapid propagation technique of *Echinodorus subalatus*

GU Fu-Gen*, SUN Bing-Yao, SU Guo-Xing, JIANG Ya-Bo, ZHOU Feng-Ming, CHEN Meng-Fei

(Medicine Department, Suzhou University, Suzhou 215123, China)

Abstract: The *in vitro* culture of *Echinodorus subalatus* was established by using the unelongated stem as explants. The method of surface sterilization of explants, the effects of different plant growth regulators on the multiplication and rooting were investigated. The results showed that 20% sterile explants could be obtained by twice surface treatment with 0.1% HgCl_2 for 8 min and 6–8 min with an interval of 24 h. When cultured on a $1/2 \text{MS}$ multiplication medium supplemented with $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of 6-BA for 42 d, the test-tube seedling exhibited a multiplication coefficient of 9.3. For optimal rooting, induction on a $1/2 \text{MS}$ rooting medium supplemented with $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of NAA for 28 d could produce rooted plantlets with 100% rooting rate, and each plantlet generated about 18 roots on average. Rooted plantlets were acclimatized and transferred into outdoor aquatic environment with 100% survival rate.

Key words: *Echinodorus subalatus*; unelongated stem; tissue culture; intermittent sterilization

长叶皇冠(*Echinodorus subalatus*)为泽泻科(Alismataceae)刺果泽泻属(*Echinodorus*)多年生观赏水生或沼生植物,自然分布于中美洲至南美洲中部,沉水叶线形,丛生,株型美观,常作为公园水景区浅水栽培的沉水观赏植物以及水族箱的背景装饰植物(占家智等,2004),观赏价值较高,具有良好的市场

前景。自然生长状态下,长叶皇冠无分枝,且结实率极低,很难进行批量生产。利用植物组织培养技术培育长叶皇冠种苗,可以克服常规繁殖方法的局限,在短时间内繁殖出大量新个体。长叶皇冠的组织培养至今未见报道,本研究采用长叶皇冠的短缩茎诱导产生丛生芽的方法,建立了适于长叶皇冠组织培

* 收稿日期: 2012-11-01 修回日期: 2013-01-06

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2007735)

作者简介: 顾福根(1964-),男,江苏苏州人,硕士,高级实验师,主要从事植物生物学实验教学与研究,(E-mail) gufugen64@163.com。

* 通讯作者(Author for correspondence)

养和快速繁殖的技术体系,对长叶皇冠的产业化生产具有一定的参考价值。本研究中,外植体的灭菌方法有一定的创新性,对水生植物的组织培养有较高的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为水培长叶皇冠当年生植株,购于苏州市皮市街花卉市场。选取水下幼嫩短缩茎作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 以 1/2 MS 培养基为基本培养基,培养基中含蔗糖 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂粉 $8\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 为 5.8~6.0。培养条件:温度(23 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,光照时间 $12\text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$,光照度 $30 \sim 40\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (顾福根等,2006)。

1.2.2 外植体的灭菌处理 选取生长旺盛的长叶皇冠植株 200 棵,剪去叶片后用自来水快速流水冲洗 10 min,再用 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HgCl_2 灭菌。灭菌时将外植体分成 8 组,每组 25 枝,分别给予各组 6、8、10、12 min 的灭菌时间,其中 5 个组灭菌 8 min。无菌水洗涤 4~5 次后,接种于 $1/2\text{MS} + 6\text{-BA } 5.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的初代培养基上,每瓶接 1 个,每组接种 25 瓶,灭菌 8 min 的 5 个组中先接种 1 个组,剩余的 4 个组将茎浸在 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 无菌蔗糖溶液中 5~10 min,倾去糖液,在培养室放置 24 h 后按上述方法再给予各组 4、6、8、10 min 的灭菌时间重新灭菌并接种(何天霖,1991),21 d 后统计外植体的污染与死亡情况,既污染又死亡的,统计在污染外植体个数中,并获得无菌初代培养物,灭菌试验重复三次。将长叶皇冠初代培养物在初代培养基上继代 3~4 次,获得足够的供试试管苗。

1.2.3 增殖培养基与生根培养基的筛选 以 1/2MS 为基本培养基,设计分别含有 6-BA($0.2.0.4.0.8.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)以及 NAA($0.0.2.0.4.0.8\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 16 个不同激素组合的培养基,将上述获得的无菌试管材料接种在这 16 个培养基上。每瓶接 1 个,每组处理 40 瓶,观察腋芽的诱导情况和生根情况,根据培养结果,筛选出丛生芽诱导培养基和生根培养基(杨银萍等,2004)。

1.2.4 试管苗切割方式的筛选 将增殖培养产生的试管苗侧枝切下后,进行不同形式的切割,并将它们

分为 7 个处理组,分别为:不纵切、纵切为 2、纵切为 3、纵切为 4、纵切为 5、纵切为 6、横切为 2,接种到筛选出的增殖培养基上培养,每处理组 40 瓶,每个芽切开后接种在同一瓶内,统计增殖率时作为一个芽计算。35 d 后统计增殖率。

1.2.5 试管苗的移栽 栽培水缸为直径 32 cm、高 40 cm 的玻璃水族缸,预先 1 周在缸底铺上高 5~8 cm 的用流水冲洗干净的河砂,盛放自来水至离缸口约 10 cm。试管苗根长到 1.0 cm 左右时移栽,每缸栽 20 株,共栽 6 缸。移栽前,先把培养瓶从培养室移到栽培水缸边炼苗 2 d,取出试管苗,用清水洗去根部培养基,移栽到水缸底的砂层中,30 d 后统计成活率。

1.3 数据处理

应用 Spss v13.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌处理对长叶皇冠短缩茎的灭菌效果

根据设计好的方法灭菌,培养 21 d 后统计结果如表 1(间歇灭菌的时间记为 $x+x$ 的形式)。

从表 1 可以看出,无论是采用单次灭菌还是采用间歇灭菌,随着灭菌时间的增加,外植体的污染率明显降低,而死亡率明显上升;从单次灭菌和间歇灭菌两种不同处理方法的效果来看,间歇灭菌具有明显的优势,在灭菌间歇为 24 h、灭菌时间为 $8\text{ min} + (6 \sim 8)\text{ min}$ 时存活的无菌外植体率最高,达 20%。因此,对于长叶皇冠短缩茎的灭菌,采用 $8\text{ min} + (6 \sim 8)\text{ min}$,间隔 24 h 的间歇灭菌法较为合适。

2.2 植物生长调节物质对长叶皇冠腋芽诱导与生根的影响

灭菌试验中存活的无菌外植体在培养 28 d 时,长成具 6~15 枚叶的小苗。这些小苗在初代培养基上继代 4 次后获得足够的供试试管苗,将这些试管苗侧芽分离,整芽接种在设计好的 16 个不同培养基上,培养 28 d 后,统计试管苗的增殖系数及平均生根数等,统计结果见表 2。

从表 2 结果看出,各激素水平组的试管苗平均高度在 3.10~3.52 cm 之间,无显著差异,苗高与激素水平关系不大;增殖系数与培养基中是否含 6-BA 关系较大,但与 6-BA 浓度的相关性较小,培养基中不含 6-BA 时,试管苗增殖系数很小,平均只有 1.3,6-BA 含量在 2.0~8.0 的培养基上,尽管 6-BA 浓

表 1 不同灭菌处理对长叶皇冠外植体污染情况的影响 (接种后 21 d)

Table 1 Effects of different sterilization treatments on contamination ratio of *Echinodorus subalatus* explants (21 d after inoculation)

灭菌时间 Sterilization time (min)	外植体数 No. of explant	污染外植体数 No. of contaminated explant	死亡外植体数 No. of dead explant	无菌外植体存活数 No. of survived sterile explant	无菌外植体存活率 Percentage of survived sterile explant (%)
6	25	23.67 ± 0.94d	0.33 ± 0.47 a	1.00 ± 0.82 a	4.00 ± 3.27 a
8	25	22.33 ± 1.25d	1.33 ± 0.47 a	1.33 ± 0.94 a	5.33 ± 3.77 a
10	25	17.67 ± 3.09 c	5.33 ± 3.09 a	2.00 ± 0.00 a	8.00 ± 0.00 a
12	25	13.00 ± 4.97 b	10.67 ± 4.71 b	1.33 ± 0.47 a	5.33 ± 1.89 a
8 + 4	25	18.00 ± 2.83 c	3.33 ± 2.36 a	3.67 ± 0.47 b	14.67 ± 1.89 b
8 + 6	25	13.67 ± 2.62 b	5.67 ± 1.70 a	5.67 ± 0.94 c	22.67 ± 3.77 c
8 + 8	25	8.33 ± 1.70 a	11.33 ± 1.89 b	5.33 ± 0.47 c	21.33 ± 1.89 c
8 + 10	25	5.33 ± 2.05 a	17.64 ± 2.05 c	2.00 ± 0.00 a	8.00 ± 0.00 a

表 2 生长调节物的不同浓度及其配比对长叶皇冠腋芽诱导及生根的影响 (接种后 28 d)

Table 2 Effects of different hormone concentrations of 6-BA/NAA on axillary bud induction and rooting of *Echinodorus subalatus* (28 d after inoculation)

生长调节物浓度 Concentration of growth regulators (mg · L ⁻¹)		平均苗高 Average height of shoot	增殖系数 Multiplication coefficient	平均每株 生根数 Average number of root	平均根长 Average length of root (cm)	开始生根时的 培养天数 Days from inoculation to rooting
6-BA	NAA					
0	0	3.51 ± 0.48 a	1.42 ± 0.49 a	15.92 ± 4.09 ab	5.81 ± 1.38 j	11
0	0.2	3.20 ± 0.52 a	1.42 ± 0.64 a	18.17 ± 3.91 b	4.51 ± 0.90 h	13
0	0.4	3.42 ± 0.58 a	1.17 ± 0.37 a	17.50 ± 3.64 ab	2.22 ± 0.44 e	14
0	0.8	3.49 ± 0.75 a	1.08 ± 0.28 a	16.00 ± 3.14 ab	1.28 ± 0.43 bc	16
2.0	0	3.32 ± 0.51 a	2.92 ± 0.64 b	16.50 ± 3.93 ab	5.08 ± 1.09 i	12
2.0	0.2	3.41 ± 0.54 a	2.67 ± 0.75 b	18.08 ± 3.01b	3.81 ± 0.84 g	13
2.0	0.4	3.31 ± 0.45 a	2.50 ± 0.65 b	17.67 ± 3.37 ab	2.02 ± 0.49 e	15
2.0	0.8	3.31 ± 0.51 a	2.50 ± 0.76 b	16.08 ± 3.40 ab	1.20 ± 0.39 bc	17
4.0	0	3.41 ± 0.49a	2.92 ± 0.76 b	15.83 ± 3.72 ab	2.91 ± 0.58 f	14
4.0	0.2	3.21 ± 0.59 a	2.92 ± 0.76 b	18.08 ± 2.93 b	2.19 ± 0.39 e	15
4.0	0.4	3.52 ± 0.49 a	2.67 ± 1.11 b	16.42 ± 3.12 ab	1.42 ± 0.34 cd	16
4.0	0.8	3.32 ± 0.49 a	2.58 ± 0.49 b	15.00 ± 3.46ab	0.71 ± 0.15 ab	21
8.0	0	3.10 ± 0.40 a	3.08 ± 1.07 b	17.25 ± 2.09 ab	1.92 ± 0.59 de	15
8.0	0.2	3.21 ± 0.41 a	3.00 ± 1.04 b	17.58 ± 2.02 ab	1.21 ± 0.34 bc	17
8.0	0.4	3.41 ± 0.43 a	2.83 ± 1.11 b	16.17 ± 2.82 ab	0.80 ± 0.16 bc	20
8.0	0.8	3.20 ± 0.43 a	2.92 ± 1.08 b	14.58 ± 2.63 a	0.50 ± 0.09 a	23

度跨度很大,但增殖率变化很小,平均在 2.50 ~ 3.08 之间,当浓度为 8.0 mg · L⁻¹ 时,试管苗叶片生长不正常,并间有玻璃化苗产生,说明这一浓度已偏高;增殖系数与 NAA 浓度关系不大。因此认为较为合适的增殖培养基为 1/2MS + 6-BA 2.0 ~ 4.0 mg · L⁻¹。在增殖培养时还发现,腋芽萌发与试管苗切口有关,一般是切口边上的芽才被诱导萌发。

各激素水平组的平均生根数在 14.58 ~ 18.17 之间,与激素水平的关系较明显,在 NAA 浓度为 0.2 mg · L⁻¹、6-BA 浓度为 0 ~ 4.0 mg · L⁻¹ 的培养基上,试管苗生根数最多;生根苗的平均根长与 6-BA 和 NAA 的浓度均十分明显地成反相关,同时试管苗

从接种到开始生根的间隔天数随激素浓度的增加而延长,不加激素时,生根数略少,但出根最早。因此认为较为合适的生根培养基为 1/2MS + NAA 0.2 mg · L⁻¹。

根据上述试验及分析,将试管苗纵切为 4 份后,接种到分别添加 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mg · L⁻¹ 6-BA 的基本培养基上,每处理 60 个芽,每个芽切开后接种在同一瓶内,统计增殖率时作为一个芽处理。观察记录生长情况,42 d 后统计增殖率依次为 7.7、8.4、8.8、9.3、9.6,显然试管苗的增殖系数随 6-BA 浓度的增加而增大,当 6-BA 浓度为 7.0 mg · L⁻¹ 时,试管苗中有水渍状玻璃化现象出现,说明此时 6-BA 浓度已偏高,开始对试管苗产生不良影响。因此,长

叶皇冠的增殖培养基以 $1/2MS + 6-BA \ 6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为佳。本实验结果表明: 试管苗切割后对 6-BA 更敏感, 增殖系数也大大提高。

2.3 切割方式对长叶皇冠试管苗增殖率的影响

将增殖培养产生的试管苗进行不同形式的切割, 分别为不切、纵切为 2~6 份, 以及横切为 2 并接种在 $1/2MS + 6-BA \ 6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的增殖培养基上培养, 35 d 后统计增殖率结果依次为 2.9、5.6、7.8、8.5、7.8、7.2、9.4, 从中可以看出, 进行纵切时增殖系数明显随切割次数的增加而增大, 但当切割得太小时, 常有培养物在培养过程中死亡的现象, 本实验中纵切成 5、6 份时, 增殖系数比纵切成 4 份的有所降低。进行横切时增殖系数明显比纵切时高, 但由于茎很短, 不是每个材料都可以横切。因此, 在试管苗增殖培养时, 应视短缩茎的长度决定是否进行横切, 再视茎的粗细情况, 决定纵切的份数。根据经验, 一般茎的长度在 5 mm 以上时可以横切, 茎的直径在 4 mm 以上时可以纵切为 4 份, 茎较细时可以纵切成 3 份或 2 份, 茎太细时不切, 避免因切得过小而使培养物在培养过程中死亡, 反而导致增殖率降低。

2.4 移栽试管苗的生长情况

将已炼苗 2~3 d 的生根试管苗移栽到玻璃缸中, 14 d 后移栽苗开始长出新叶, 30 d 后统计, 成活率达 100%。

3 结论与讨论

3.1 关于长叶皇冠同属植物的组织培养

与长叶皇冠同属的水生植物中, 红蛋 (*Echinodorus osiris*)、红玫瑰 (*E. horemanii*) 的组织培养已获成功, 但其灭菌方法、所用激素种类及浓度与长叶皇冠的组织培养过程中使用的方法有很大的差异 (张红梅等, 2003), 因此, 长叶皇冠组培快繁技术体系的建立, 有一定的理论和应用价值。

3.2 关于长叶皇冠外植体的间歇灭菌

获得无菌外植体是植物组织培养的前提, 采用常规的灭菌方法难以获得水生植物无菌外植体 (孙月芳等, 2004), 因而, 有关水生植物组织培养的报道很少。本研究借鉴何天霖 (1991) 的温度间歇灭菌法, 设计药物间歇灭菌法应用于长叶皇冠外植体灭菌, 大大提高了其消毒成功率。间歇灭菌法产生较好灭菌效果的可能原因是: (1) 间歇前灭菌能把正常生长的菌类杀灭, 而一些处在休眠状态的孢子

在短时间内不能被灭菌剂灭杀, 但可在灭菌间歇期被诱导萌发, 在间歇后灭菌中被灭杀, 从而提高灭菌效果; (2) 间歇灭菌法把一个较长灭菌时间拆分为两个较短灭菌时间, 减轻了消毒剂对外植体的损伤, 从而降低了死亡率。本研究采用灭菌时间为 8 min + 6~8 min、间歇时间 24 h 的方法, 对长叶皇冠短缩茎进行间歇灭菌, 效果较好。

灭菌间歇期间外植体用低浓度的糖水浸泡, 灭菌效果会更好, 这是几年前在做水芹组织培养时发现的, 当时做过三次对比试验, 均为用糖水浸泡的试验组无菌外植体获得率高于对照组, 这与溶液中的蔗糖是绝大多数微生物生长的营养物质、能诱使其休眠孢子快速萌发有关, 因此, 本研究中采用这一方法, 效果良好。

3.3 关于长叶皇冠试管苗的增殖培养

在长叶皇冠试管苗的增殖培养过程中, 发现切割完整小苗进行培养增殖效果不佳, 对 6-BA 的浓度变化不敏感, 但把茎切开后在切面边上的腋芽较易被诱导萌发, 随着切面的增多, 增殖率也相应提高。产生这种现象的可能原因是腋芽原基受某种物质的抑制而在正常生长条件下不能萌发, 当受到创伤时, 这种物质随伤流流出体外或合成受阻, 腋芽的抑制作用被消除或减轻, 在一定条件下, 这些休眠芽被诱导萌动。本实验中采取纵切的方法来扩大试管苗的受创面, 操作方便, 增殖效果良好。横切后的增殖效果明显比纵切的好, 但由于长叶皇冠试管苗的茎很短, 操作难度较大, 一些长度大于 5 mm 的茎段可以进行一次横切, 以提高增殖率。因此, 本文发现将茎段四纵切或横切能有效提高长叶皇冠组培增殖率的方法, 对同属的水生植物组培方法的改进有一定的参考价值。

3.4 关于长叶皇冠试管苗的生根培养

实验结果表明, 在增殖培养阶段, 只有横切后的茎尖端在增殖培养时大多不生根, 需要进行生根诱导培养; 其它的切割方法在增殖阶段同时也能生根, 只是因激素水平不同, 出现生根的时间有早有晚, 因此, 在实际应用中, 可以将增殖培养形成的丛生苗分离后选取具多个根的小苗直接炼苗并移栽, 将生根少的小苗用于增殖继代。但从产业化生产要求的短周期、低成本和统一管理角度出发, 成批量的生根培养是必须的, 其较理想的生根培养基为 $1/2MS + NAA \ 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(下转第 262 页 Continue on page 262)

真菌主要是一些土生菌,不存在腐木或活立木生真菌,加上林下土壤贫瘠,且林中受到人为因素的干扰,因而大型真菌资源较少。之前虽然何炎炘等(2012)对保护区的大型真菌资源也有报道,但数量较少,不完整,且对不同植被类型中大型真菌的分布没有比较,因而本文的真菌资源调查更为全面。但由于资料有限,所采集的标本少量只鉴定至科或属,后期我们将继续开展该地区的大型真菌资源调查,以期更准确科学地提供相关的资料,为保护区合理开发利用大型真菌资源提供有力的证据。

参考文献:

- 李玉,图力古尔. 2003. 中国长白山蘑菇 [M]. 北京: 科学出版社: 1-271
- Cai J(蔡静), He JQ(何家庆). 2010. Research of model plants and native woody ornamental plants in Yaoluoping Natural Reserve(鹤落坪保护区模式地植物及乡土观赏树种研究) [J]. *Guizhou J. Bot*, 30(2): 224-232
- Chen Y(陈晔), Xu ZG(徐祖国), Zhang KH(张康华), et al. 2000. The ecological distribution of the macrofungi in Lushan Mountain(庐山大型真菌的生态分布) [J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), 20(4): 702-706
- Demirel K, Uzun Y. 2002. Macrofungi of Agri Province [J]. *Turk J Bot*, 26: 291-295
- Fadime Y, Mustafa I. 2002. Macrofungi of Degirmangobazı(Balıkesir) [J]. *Turk J Bot*, 26: 161-164
- Genevieve MG, Caroline M, David AR, et al. 2011. Diversity and ecology of epigeous ectomycorrhizal macrofungal assemblages in a native wet eucalypt forest in Tasmania, Australia [J]. *Fung Ecol*, 4: 290-298
- Gregory MM, John P, Schmit, et al. 2007. Global diversity and distribution of macrofungi [J]. *Biodiv Cons*, 16: 37-48
- Guo JR(郭建荣). 2005. Large-Fungus category and its exploitation in Luyashan Nature Reserve(芦芽山保护区大型真菌种类及其利用) [J]. *Shanxi For Sci Technol*(山西林业科技), 3: 24-25
- He YX(何炎炘), Li NS(李树能), Li JH(李进华). 2012. Ecological distribution of macrofungi in Yaoluoping Natural Reserve(鹤落坪自然保护区大型真菌的生态分布) [J]. *J Biol*(生物学报), 29(2): 37-41
- Kaya A. 2005. Macrofungi determined in Golbasi(Adıyaman) District [J]. *Turk J Bot*, 29: 45-50
- Li SJ(李殊江), Zhu TH(朱天辉). 2011. Macro-fungi and Standing Tree Rot(大型真菌与立木腐朽) [J]. *J Sichuan For Sci Tech*(四川林业科技), 32(1): 59-64
- Miyazaki T, Oikawa N, Yamada H. 1977. Studies on fungal polysaccharides. XX. Galactomannan of *Cordyceps sinensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 25(12): 3324-3328
- Paula B, Anabela M, Rui M, et al. 2010. Diversity and fruiting pattern of macrofungi associated with chestnut(*Castanea sativa*) in the Trás-os-Montes region(Northeast Portugal) [J]. *Fung Ecol*, 3: 9-19
- Peksen A, Karaca G. 2003. Macrofungi of Samsun Province [J]. *Turk J Bot*, 27: 173-184
- Shang ZH(尚占环), Yao AX(姚爱兴). 2002. Biodiversity and biodiversity protection(生物多样性与生物多样性保护) [J]. *Grass Turf*(草原与草坪), 4: 11-13
- Swapna S, Syed A, Krishnappa M. 2008. Diversity of macrofungi in semi-evergreen and moist deciduous forest of Shimoga District-Karnataka, India [J]. *J Mycol Pl Pathol*, 38(1): 21-26
- Wang YX(王义勋), Chen JY(陈京元). 2010. Biodiversity, Resources Utilization of Macrofungi in Hubei(湖北省大型真菌生物多样性及资源开发利用) [J]. *Hubei For Sci Technol*(湖北林业科技), 6(166): 36-39
- Yesil OM, Yildiz A. 2004. Contributions to the macrofungi flora of Batsman Province [J]. *F U Fen ve Muhendislik Bilimleri dergisi*, 16(1): 11-16

(上接第 184 页 Continue from page 184)

参考文献:

- 占家智, 羊茜, 明宝红, 等. 2004. 观赏水草的栽培与饰景 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社: 120-121
- 何天霖. 1991. 常压间歇灭菌法的应用 [J]. *浙江食品工业*, 3(1): 19-20
- Gu FG(顾福根), Wan ZG(万志刚), Yan SY(颜顺意). 2006. Tissue culture and rapid propagation of *Myriophyllum verticillatum*(轮叶狐尾藻的组织培养和快速繁殖) [J]. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), 42(3): 470
- Sun YF(孙月芳), Lu RJ(陆瑞菊), Zhou RM(周润梅), et al. 2004. *In vitro* culture of ornamental waterweeds(观赏水草的离体培养) [J]. *Acta Agric Shanghai*(上海农业学报), 20(2): 17-19
- Yang YP(杨银萍), Shi YM(史益敏), Tao YW(陶懿伟). 2004. Tissue culture and rapid propagation of *Haemanthus albiflos*(虎耳兰的组织培养和快速繁殖) [J]. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), 40(4): 462
- Zhang HM(张红梅), Ji H(及华), Xiao XQ(肖小琴), et al. 2003. Tissue culture and rapid propagation of *Echinodorus osiris*(红蛋的组织培养的快速繁殖) [J]. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), 39(4): 338