

野生桑黄菌株的分离、鉴定和次生代谢物分析

黄丽洋, 石 卉, 王晓婷, 范桂枝*

东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 对4种不同树种来源的桑黄菌株进行分离、鉴定, 并对次生代谢物进行分析。 **方法** 将分离纯化的菌株采用光学显微镜观察其菌丝形态特征, 利用 ITS 序列分析技术对其进行分子鉴定, 采用比色法分析次生代谢物量。 **结果** 从松树桑黄、桑树桑黄、暴马丁香树桑黄、杨树桑黄分离的菌株, 其菌丝体形态特征相同, 呈有隔分支, 而菌落的生长速率和外观颜色不同, 其中杨树桑黄的生长速率最快, 达 0.47 cm/d。进一步通过 ITS 序列分析发现, 松树桑黄菌株为松木层孔菌 *Phellinus pini*, 桑树桑黄菌株为裂蹄木层孔菌 *Phellinus linteus*, 暴马丁香桑黄菌株和杨树桑黄菌株为鲍氏木层孔菌 *Phellinus baumii*。对多糖、黄酮、多酚和三萜物质的分析发现, 子实体和菌丝体中均含有这些次生代谢物, 但其量与菌株来源有关。暴马丁香树来源的子实体中多糖量最高, 为 98.20 mg/g; 杨树来源的子实体中黄酮、三萜、多酚量最高, 分别为 548.49、1.48、33.70 mg/g。菌丝体中多糖、黄酮、多酚和三萜物质产量累积最高的菌株来源于桑树, 分别为 259.64、223.11、43.78、24.80 mg/L; 同时发现, 菌丝体中的三萜量高于子实体, 其中桑树菌丝体中的三萜量是子实体的 7 倍左右。 **结论** 4 株桑黄菌株菌丝体形态基本无差异, rDNA ITS 序列分析技术可以鉴定桑黄菌株; 4 株桑黄菌丝和子实体中次生代谢物量存在差异。

关键词: 桑黄; 子实体; 菌丝; 次生代谢物; rDNA ITS 序列

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)23-3394-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.024

Isolation and identification for strains from wild *Phellinus* and analysis on its secondary metabolites

HUANG Li-yang, SHI Hui, WANG Xiao-ting, FAN Gui-zhi

College of Life Sciences of Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To isolate and identify the strains from wild *Phellinus linteus* and analyze its secondary metabolites. **Methods** Strains isolated and purified were investigated by optical microscope to observe the characteristics of mycelia, ITS sequence was used for molecular identification and its secondary metabolite content was analyzed by chemical colorimetry. **Results** The morphological characteristics of mycelia from *pinus*, *Morus alba*, *Syringa reticulata*, and *populus* were the same. The growth rate of four filamentous colonies and their colors were different, wherein the growth rate of the colony from *M. alba* was the fastest, up to 0.47 cm/d. Four strains all belonged to genus *Phellinus* sp, where strain from *pinus* was identified as *P. pini*, *M. alba* was *P. linteus*, *S. reticulata* and *populus* were *P. baumii*. The species of the secondary metabolites in the sporocarp and mycelia of *Phellinus* were the same, but the content was different. For the sporocarp, the highest polysaccharide content was in the sporocarp from *S. reticulata* with the content of 98.20 mg/g, the highest flavonoids, terpenoids, and polyphenols contents were all in the sporocarp from *poplar* with the contents of 548.49, 1.48, and 33.70 mg/g, respectively. For mycelia, the highest polysaccharide, flavonoids, terpenoids, and polyphenols contents were all in the mycelia of *M. alba*, the contents were 259.64, 223.11, 43.78, and 24.80 mg/L, respectively. Additionally, the content of terpenoids in the mycelia was higher than that of the sporocarp. Among them, the content of terpenoids in the mycelia from *M. alba* was about 7 times as that in fruit body. **Conclusion** There are no differences among form of mycelia from four strains of *P. linteus*. rDNA ITS sequence analysis could be used for the identification of strains. The species four *Phellinus* strains and its secondary metabolite content are clarified.

Key words: *Phellinus*; sporocarp; mycelia; secondary metabolites; rDNA ITS sequence

桑黄属针层孔菌属 *Phellinus*, 又称桑臣、桑耳等, 有“森林黄金”之美称。在我国传统中药中用于治疗痢疾、盗汗、血崩、血淋、脱肛和闭经等^[1-2];

现代药理学研究发现桑黄还具有抗癌、抗肿瘤、免疫调节等功能^[3-5], 是目前国际公认的生物治癌领域中有效率排在第一位的真菌^[6]。

收稿日期: 2013-06-05

基金项目: 东北林业大学本科生创新性实验项目 (201210225108); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12513037)

*通信作者 范桂枝 Tel: (0451)82191752 E-mail: gzf325@126.com

由于桑黄野生资源的日益匮乏,加之人工栽培难度大、周期长,这已限制了对桑黄的进一步开发和利用。桑黄菌丝体的成分类似于子实体的活性成分,含多糖、黄酮、香豆素和三萜等物质^[7],因而通过发酵培养桑黄菌丝体备受关注。发酵培养桑黄菌丝产活性成分已取得一定成果,但目前尚未进行规模化商品生产,主要问题是没有高产菌和菌株性能的不稳定性。

野生桑黄多生于松树、杨树、柳树、桦树、桃树、栎树等阔叶树的枯立木上及树干上^[8],该属的子实体均呈褐色蹄形,可入药,外观具有相似之处较多,使得依赖于形态特征的传统鉴定较为困难,但是即使亲缘关系非常接近的2个种却能在ITS序列上表现出差异^[9],因此应用rDNA ITS序列分析技术对其进行分子鉴定,对更好地认识和利用桑黄真菌具有重要意义。本实验对4株长在不同树种上的桑黄真菌进行分离、鉴定和次生代谢物分析,该研究的完成将为明确桑黄真菌种属来源、子实体和发酵培养菌丝体中有效成分量的差异提供帮助,同时为菌株培养及有效成分使用提供依据。

1 材料

4种不同树种来源的桑黄 *Phellinus yucatanensis* (Murr.) Imaz. 子实体经东北林业大学汪春蕾副教授鉴定分别为松树桑黄 *pinus* Linn.、桑树 *Morus alba* L. 桑黄、暴马丁香 *Syringa reticulata* var. *mandshurica* Hara 桑黄、杨树 *populus* L. 桑黄,均由长白山特产销售公司提供。

2 方法

2.1 桑黄菌株的分离及纯化

取新鲜桑黄子实体,用干净刷子刷去菇体表面的杂质,用75%乙醇进行表面消毒,然后置于无菌烧杯中备用。将已消毒的子实体在无菌超净工作台上切开,用已灭菌的解剖刀在菌片中央切取米粒大的组织块,接入无菌的马铃薯培养基表面,倒置于25℃恒温箱中培养。待长出菌丝后,取生长快的菌丝,移入另一无菌平板培养基表面培养,待长出菌丝后,取生长快、无杂菌污染的菌丝块,移入斜面培养基表面培养,如此反复几次,菌丝长满斜面且无杂菌,即为桑黄菌母种。

2.2 桑黄菌株的鉴定

2.2.1 菌丝体的显微观察 挑取少量菌丝,压片后置于光学显微镜下观察菌丝体形态并拍照。

2.2.2 桑黄菌株的分子鉴定

(1) DNA的提取 采用改良的CTAB法提取DNA^[10],得到的DNA作为PCR扩增的模板。

(2) PCR扩增 采用真菌rRNA基因的ITS区扩增通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增^[11]。PCR扩增体系包括(20 μL): DNA模板2 μL, 10 μmol/L的上下游引物各1 μL, 10×PCR缓冲液2 μL, dNTPs 1.6 μL, rTaq聚合酶0.2 μL, ddH₂O 12.2 μL。反应程序为94℃预变性3 min; 94℃变性30 s; 54℃退火30 s; 72℃延伸50 s, 32个循环; 72℃终延伸7 min。PCR产物于1%琼脂糖凝胶电泳分离,并于凝胶成像系统下观察并照相。

(3) rDNA ITS序列测定与分析 上述PCR反应产物送华大生物技术有限公司进行双向序列测定,测序后用Seq-MAN软件进行序列拼接。用BLAST程序对测得的rDNA ITS序列依次和GenBank中已登录桑黄菌的rDNA ITS序列进行同源性比较,并下载已登录桑黄菌同源rDNA。采用MEGA 5.1分子进化遗传分析软件计算菌株间的遗传距离,并通过Neighbor-Joining法构建各菌株基于rDNA ITS序列的系统发育进化树。

2.3 次生代谢物定量分析

2.3.1 样品前处理 桑黄子实体和经滤纸吸干水分的菌丝体在60℃条件下烘干至恒质量,研磨成粉末备用。

2.3.2 多糖的测定 精密称取50 mg干燥后的样品粉末于10 mL离心管中,加入3 mL蒸馏水浸提1 d, 90℃水浴1 h,超声提取40 min,混匀静置。用浓硫酸配成0.2%的蒽酮试剂,测定时吸取适量的多糖提取液于10 mL的离心管中,以蒸馏水补足1 mL,加入0.2%蒽酮-硫酸试剂2 mL(冰水浴),混匀后沸水浴6 min,冷却至室温,在620 nm处测定吸光度^[12]。以试剂空白为对照,测定标准曲线为 $Y=49.768X+0.0433$, $r=0.9916$ 。

2.3.3 黄酮的测定 精密称取50 mg干燥后的样品粉末于10 mL离心管中,加入3 mL 70%乙醇浸提1 d, 45℃水浴1 h,超声40 min,混匀静置。用70%的乙醇配成硼酸-乙酸钠络合试剂(硼酸0.8%,乙酸钠1%),测定时吸取适量的总黄酮提取液于10 mL的离心管中,以70%乙醇补足至2 mL,加入2 mL络合试剂,混匀后于384 nm处测吸光度^[13]。以试剂空白为对照,测定标准曲线为 $Y=2.5419X-0.0031$, $r=0.9991$ 。

2.3.4 三萜的测定 精密称取 50 mg 干燥的样品粉末于 10 mL 离心管中, 加入 3 mL 95%乙醇浸提 1 d, 70 °C 水浴 1 h, 超声 40 min, 混匀静置。用冰乙酸配成 5%的香草醛试剂, 测定时吸取适量的总三萜提取液于 10 mL 的离心管中, 70 °C 水浴蒸干, 加入新配置的 5%香草醛-冰醋酸 200 μL 和高氯酸 800 μL, 70 °C 水浴反应 20 min, 流水冷却至室温, 加入醋酸乙酯定容至 5 mL, 混匀后在 551 nm 处测定吸光度^[14]。以试剂空白为对照, 测定标准曲线为 $Y=45.036 X+0.0417$, $r=0.9956$ 。

2.3.5 多酚的测定 精密称取 50 mg 干燥后的样品粉末于 10 mL 离心管中, 加入 3 mL 70%乙醇浸提 1 d, 70 °C 水浴 1.5 h, 超声 40 min, 混匀静置。用蒸馏水配成的 10%Folin-Ciocalteu 试剂, 测定时去适量上清液于 10 mL 离心管中, 加入 Folin-Ciocalteu 显色剂 2 mL, 混匀避光反应 5 min, 迅速加入 NaCO₃ 溶液补足 4 mL, 混匀后于 25 °C 条件下放置 1 h, 以试剂空白为对照, 在 765 nm 处测吸光度^[15]。测定标准曲线为 $Y=100.75 X+0.0142$, $r=0.9985$ 。

3 结果与分析

3.1 桑黄菌株的菌落和菌丝形态特征

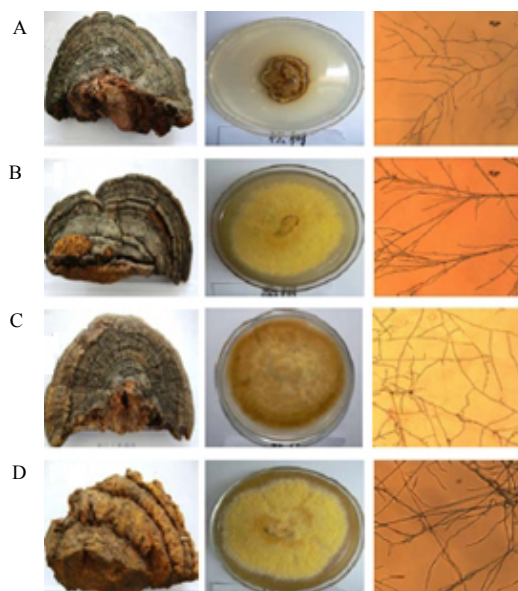
不同来源桑黄子实体中分离的桑黄菌株的菌落和菌丝形态特征见图 1, 分离的桑黄菌株接种到马铃薯培养基 25 d 后, 桑树桑黄、暴马丁香桑黄、杨树桑黄和松树桑黄的生长速率分别为 0.28、0.30、0.47、0.04 cm/d, 并且 4 种菌落的颜色不同, 杨树桑黄和桑树桑黄的颜色较浅呈黄色, 而暴马丁香桑黄和松树桑黄的菌落颜色较深呈褐色。采用光学显微镜对 4 株桑黄菌丝的形态观察发现, 菌丝体形态基本一致, 均为有隔分支。

3.2 桑黄菌株的 DNA 提取和 PCR 扩增

4 株桑黄菌丝体基因组 DNA 提取后的电泳检测结果见图 2, 4 株桑黄菌种的 DNA 条带均清晰可见, 且相对分子质量大小相同。利用 ITS1 和 ITS4 为引物进行 PCR 扩增的产物电泳结果见图 3, PCR 产物片段单一, 长度均为 750 bp 左右。

3.3 4 株桑黄菌种间的遗传距离

经过 MEGA 5.1 分子进化遗传软件分析发现, 4 株桑黄菌株的 rDNA ITS 序列与 GenBank 中下载的 18 条同源 rDNA ITS 序列间的遗传距离在 0~0.100 (表 1), 表明它们之间的遗传关系较近, 其遗传分化可能发生很晚, 因而分化程度及遗传多样性较低。1~22 代表桑黄菌株 rDNA ITS 序列登录号和供试



A-松树桑黄 B-桑树桑黄 C-暴马丁香 D-杨树桑黄
A-*P. linteus* from *pinus* B-*P. linteus* from *M. alba* C-*P. linteus* from *S. reticulata* D-*P. linteus* from *populus*

图 1 桑黄菌株的菌落与菌丝的形态特征
Fig. 1 Morphological characteristics of colony and mycelia from *P. linteus* strains

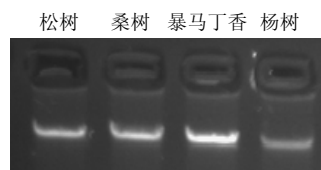


图 2 桑黄菌丝基因组 DNA 的凝胶电泳图
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of four *Phellinus* mycelia

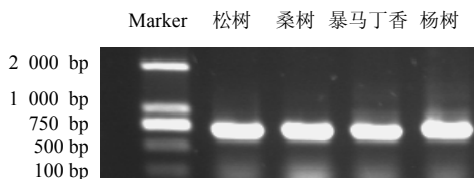


图 3 桑黄菌丝 rDNA ITS 序列扩增电泳图
Fig. 3 Electrophoresis analysis of amplified product of *Phellinus* mycelia rDNA ITS sequences

菌株编号, 分别为 AF077678、AF080457、AF080458、AF082101、AF082102、AF153009、AF200226、AF200227、AF200228、AF200231、AF200242、AF250930、AF420589、AF534068、AF534069、AY089743、AY089744、EF694971、松树桑黄菌株、桑树菌株、暴马丁香菌株、杨树菌株。

表 1 桑黄菌株间的遗传距离
Table 1 Genetic distance among *Phellinus* strains

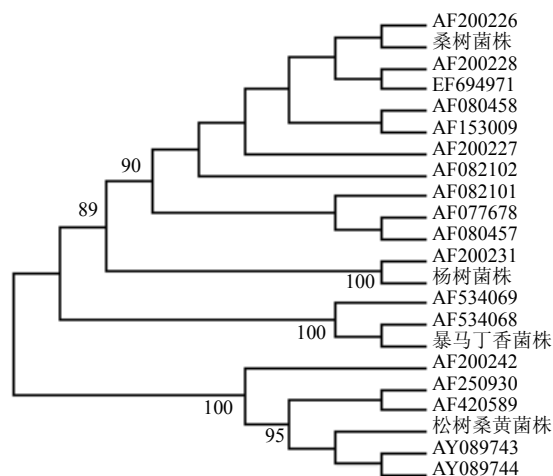
编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1																					
2	0																				
3	0	0																			
4	0	0	0																		
5	0.002	0.002	0.002	0.002																	
6	0	0	0	0	0.002																
7	0	0	0	0	0.002	0															
8	0	0	0	0	0.002	0	0														
9	0	0	0	0	0.002	0	0	0													
10	0.016	0.016	0.016	0.016	0.018	0.016	0.016	0.016	0.016												
11	0.092	0.092	0.092	0.092	0.094	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092											
12	0.096	0.096	0.096	0.096	0.098	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.006										
13	0.094	0.094	0.094	0.094	0.096	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.004	0.002									
14	0.024	0.024	0.024	0.024	0.026	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.092	0.098	0.096								
15	0.024	0.024	0.024	0.024	0.026	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.092	0.098	0.096	0							
16	0.096	0.096	0.096	0.096	0.098	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.006	0.004	0.002	0.098	0.098						
17	0.098	0.098	0.098	0.098	0.100	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.008	0.006	0.004	0.100	0.100	0.002					
18	0	0	0	0	0.002	0	0	0	0	0.016	0.092	0.096	0.094	0.024	0.024	0.096	0.098				
19	0.096	0.096	0.096	0.096	0.098	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.006	0.004	0.002	0.096	0.096	0	0.002	0.096			
20	0	0	0	0	0.002	0	0	0	0	0.016	0.092	0.096	0.094	0.024	0.024	0.096	0.098	0	0.096		
21	0.024	0.024	0.024	0.024	0.026	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.092	0.098	0.096	0	0	0.098	0.100	0.024	0.096	0.024	
22	0.016	0.016	0.016	0.016	0.018	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.090	0.094	0.092	0.024	0.024	0.094	0.096	0.016	0.094	0.016	0.024

3.4 4 株桑黄真菌 rDNA ITS 序列的聚类分析

采用 Neighbor-joining (NJ) 法构建的系统发育树见图 4, 松树桑黄菌株与松木层孔菌 *Phellinus pini* AF200242 的菌株亲缘关系最近, 其序列的相似性为 99%。桑树菌株与裂蹄木层孔菌 *Phellinus linteus* AF200226 的菌株亲缘关系最近, 其序列的相似性为 100%。暴马丁香菌株与鲍氏针层孔菌 *Phellinus baumii* AF534069 的菌株亲缘关系最近, 其序列相似性为 100%。杨树菌株与鲍氏木层孔菌 AF200231 的菌株亲缘关系最近, 其序列相似性为 99%。因此初步鉴定松树桑黄菌株为松木层孔菌, 桑树桑黄菌株为裂蹄木层孔菌, 暴马丁香桑黄菌株和杨树桑黄菌株为鲍氏针层孔菌。

3.5 桑黄子实体中次生代谢物量的变化

由图 5 可知, 不同来源桑黄子实体中多糖、黄酮、三萜和多酚 4 种次生代谢物的量不同。子实体中多糖量最高的为暴马丁香桑黄, 其多糖量为 98.20 mg/g, 而黄酮、三萜和多酚量最高的均为杨树桑黄,



系统发育树干枝上数字为 bootstrap 值 (1 000 次重复, 60%以下未显示), 代表分类单位被聚在一起的几率 (%); Numbers (%) on main branches represented bootstrap support values (for 1 000 iterations, lower than 60% were not shown)

图 4 基于桑黄真菌 rDNA ITS 序列的 NJ 系统发育树
Fig. 4 NJ phylogenetic tree based on rDNA ITS sequences of *Phellinus*

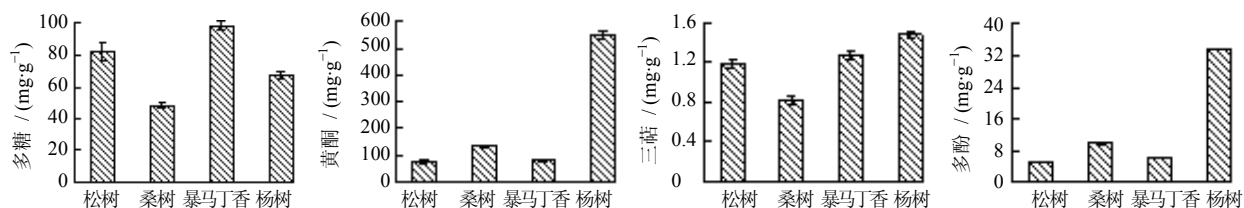


图 5 桑黄子实体中次生代谢物量的变化图

Fig. 5 Content of secondary metabolites in sporocarp of *Phellinus*

其质量分数分别为 548.49、1.48、33.70 mg/g。

3.6 桑黄菌丝体中次生代谢物量的变化

在一个培养周期内，桑黄菌丝体的干质量和次生代谢物累积量见表 2。干质量累积量最高的菌丝体为暴马丁香桑黄，干质量值达 8.48 g/L，而次生代谢物质量

分数和产量积累最高的菌丝体为桑树桑黄，其多糖、黄酮、三萜和多酚量与产量分别为 36.86 mg/g 和 259.64 mg/L、31.66 mg/g 和 223.11 mg/L、6.22 mg/g 和 43.78 mg/L、3.53 mg/g 和 24.80 mg/L。同时，菌丝体中次生代谢物产量由高到低为多糖、黄酮、三萜和多酚。

表 2 桑黄菌丝体中次生代谢物的产量变化 (n=3)

Table 2 Production of secondary metabolites in mycelia of *Phellinus* (n=3)

菌丝体	干质量 / (g·L ⁻¹)	多 糖		黄 酮		三 萜		多 酚	
		质量分数 / (mg·g ⁻¹)	产量 / (mg·L ⁻¹)	质量分数 / (mg·g ⁻¹)	产量 / (mg·L ⁻¹)	质量分数 / (mg·g ⁻¹)	产量 / (mg·L ⁻¹)	质量分数 / (mg·g ⁻¹)	产量 / (mg·L ⁻¹)
松树	7.71±0.88	29.30±9.49	224.78±76.61	12.24±1.50	100.15± 8.86	3.30±0.43	25.29±2.60	1.75±0.55	13.22±2.78
桑树	7.04±0.16	36.86±6.49	259.64±47.91	31.66±2.27	223.11±20.89	6.22±0.13	43.78±1.93	3.53±0.36	24.80±2.00
暴马 丁香	8.48±0.50	16.54±0.77	139.20±17.67	19.03±0.67	161.18± 4.75	2.43±0.26	20.52±3.86	2.40±0.58	20.24±4.24
杨树	6.59±0.69	29.22±5.73	190.87±29.74	4.41±1.47	28.42± 6.33	3.34±0.04	21.75±2.96	0.81±0.14	5.28±0.34

4 讨论

桑黄菌大多寄生于桑树、杨树、柳树、桦树、桃树等阔叶植物的枯立木及树干上，在我国大部分地区均有分布。由于桑黄属的子实体均呈蹄形，因此难以从外观形态上鉴定菌株归属的种。

另外，与桑黄真菌在外观形态上相似的大型真菌种类很多，也为鉴定带来一定的困难^[16]。为此，本研究将分离的桑黄菌株从形态特征和分子水平 2 个层次进行了分析，研究发现，固体平板培养一段时间之后每种菌株在形态特征上表现出生长速率和外观形态的差异，如桑树和杨树树种菌株表现为黄色或淡黄色，松树和暴马丁香种菌株表现为黄褐色。对其生长速度进行了统计，杨树树种的菌株生长较快，桑树和暴马丁香的菌株速度相当，松树树种的菌株生长较慢。对不同来源的桑黄菌丝体的形态观察发现，其菌丝形态基本一致，均为多分支，各分支存在交联现象。利用 rDNA ITS 序列分析和依据 rDNA ITS 序列信息构建 NJ 系统发育树发现，4 株桑黄真菌明显分区，独立成组，并将 4 株桑黄真菌鉴定为松树菌株为松木层孔菌，桑树菌株为裂蹄木

层孔菌暴马丁香菌株和杨树菌株为鲍氏针层孔菌。进一步经过 MEGA 5.1 分子进化遗传软件分析发现，4 株桑黄菌株的 rDNA ITS 序列与 GenBank 中下载的 18 条同源 rDNA ITS 序列间的遗传距离在 0.000~0.100，表明它们之间的遗传关系较近。由此可见，桑黄真菌在菌丝形态上基本无差异，但菌丝的生长速率以及其 rDNA ITS 序列存在一定的差异，这为桑黄菌株的鉴定提供了一定的鉴定依据。

本实验分析了 4 株不同树种来源桑黄子实体中的次生代谢物量，发现多糖量最高的是菌株来源于暴马丁香种，为 98.20 mg/g；黄酮、三萜、多酚量最高的菌株均来源于杨树树种，分别是 548.49、1.48、33.70 mg/g。这些结果与其他文献报道的结果略有不同，其原因可能为子实体中的次生代谢物量受采摘的地域环境、子实体生长周期、采摘季节等多方面因素的影响。将分离纯化的菌丝体液体培养一个周期后，分析次生代谢物产量发现，多糖、黄酮、三萜和多酚产量均为来源于桑树菌株最高，同时发现菌丝体中的三萜量是子实体三萜量的 7 倍左右。同样，回晶等^[17]的研究发现，桑黄菌丝体中的

氨基酸、粗脂肪、粗蛋白和总糖量也均高于子实体。由此可见, 次生代谢物量于桑黄菌株的来源有关, 子实体中富有的次生代谢物在菌丝体中有存在, 甚至某些次生代谢物在菌丝体中的富积程度高于子实体。

综合上述结果, 本实验明确了桑树桑黄、暴马丁香桑黄、杨树桑黄、松树桑黄真菌物种的遗传基础及其药用成分, 将为相关菌种鉴定、菌株培养及有效成分使用提供明确的参照, 以此为标准规范相关基础研究及应用开发。

参考文献

- [1] 刘 波. 中国药用真菌 [M]. 太原: 山西人民出版社, 1974.
- [2] Hsieh P W, Wu J B, Wu Y C. Chemistry and biology of *Phellinus linteus* [J]. *BioMedicine*, 2013 [http://dx. doi. org/10.1016/j. biomed. 2013. 01. 002](http://dx.doi.org/10.1016/j.biomed.2013.01.002).
- [3] Ayala-Zavala J F, Silva-Espinoza B A, Cruz-Valenzuela M R, *et al.* Antioxidant and antifungal potential of methanol extracts of *Phellinus* spp. from Sonora, Mexico [J]. *Rev Iberoam Micol*, 2012, (29): 132-138.
- [4] Wu S J, Liaw C C, Pan S Z, *et al.* *Phellinus linteus* polysaccharides and their immunomodulatory properties in human monocytic cells [J]. *J Funct Foods*, 2013, (5): 679-688.
- [5] 宋爱荣, 王光远, 赵 晨, 等. 火针层孔菌(桑黄)粗多糖对荷瘤小鼠的免疫调节研究 [J]. *菌物学报*, 2009, 28(2): 295-298.
- [6] 温 克, 陈 劲, 李 红, 等. 桑黄等四种抗癌药物抗癌活性比较 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2002, 28(3): 247-249.
- [7] 孙培龙, 魏红福, 杨 开, 等. 姬松茸多糖的分离纯化与理化性质研究 [J]. *中草药*, 2006, 37(2): 190-192.
- [8] 刘春辉, 陈体强, 林跃鑫. 桑黄菌开发前景看好 [J]. *菌物研究*, 2004, 2(2): 53-59.
- [9] Landeweert R, Leeftang P, Kuyper T W, *et al.* Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 327-333.
- [10] 曾念开, 王秋颖, 周 莹, 等. 药用真菌针层孔菌的研究进展 [J]. *中国药物杂志*, 2006, 41(15): 1128-1130, 1153.
- [11] 高 凯, 杜 明, 吕英华, 等. 10 株桑黄菌基于 rDNA ITS 序列的分子鉴定 [J]. *蚕业科学*, 2010, 36(4): 0584-0589.
- [12] 黄 灿, 王玉明, 赵 骏. 抗肿瘤活性茯苓多糖的提取、纯化与结构分析 [J]. *中草药*, 2012, 43(11): 2146-2149.
- [13] 夏国华, 戈延茹, 傅海珍, 等. 超声法提取桑黄总黄酮的工艺研究 [J]. *江苏大学学报*, 2010, 20(1): 40-55.
- [14] 李晓灿, 詹亚光, 王晓东, 等. 多胺对白桦悬浮细胞生长和三萜积累的影响 [J]. *中草药*, 2013, 44(4): 463-467.
- [15] 李文仙, 俞 丹, 林 玲, 等. Folin-Ciocalteu 比色法应用于蔬菜和水果总多酚含量测定的研究 [J]. *营养学报*, 2011, 33(3): 302-307.
- [16] 陈体强, 吴锦忠, 纪建英, 等. 桑黄栽培子实体成分分析及显微形态观察 [J]. *菌物研究*, 2005, 3(1): 30-34.
- [17] 回 晶, 李 辉, 朱春玉, 等. 桑黄子实体与菌丝体营养成分的比较分析 [J]. *特产研究*, 2009(2): 59-61.