

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.04.029

# 桑树桑黄与杨树桑黄的分子辨别

宋吉玲<sup>1</sup>, 陆娜<sup>1</sup>, 王伟科<sup>1</sup>, 袁卫东<sup>1</sup>, 李海波<sup>2</sup>,  
程俊文<sup>2</sup>, 亢学平<sup>3</sup>, 闫静<sup>1</sup>

(1. 杭州市农业科学研究院, 杭州 310024; 2. 浙江省林业科学研究院, 杭州 310023;  
3. 延边朝鲜族自治州农业科学院, 延吉 133001)

**摘要:** 为准确鉴别桑黄(*Sanghuangporus*)近缘种桑树桑黄(*S. sanghuang*)与杨树桑黄(*S. vaninii*)、暴马桑黄(*S. baumii*),本研究基于核糖体基因 rDNA 内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列分析技术,对桑黄真菌进行了系统发育分析与近缘种的分子辨别研究.结果表明,在 NJ 系统发育树上,23 个桑树桑黄、11 个杨树桑黄和 6 个暴马桑黄菌株各自以很高的 Bootstrap 支持率聚为了三个独立的分支,种间差异明显.依据桑树桑黄和杨树桑黄的 rDNA ITS 序列差异,设计两对引物 Sv\_U1/Sv\_L 和 Sv\_U2/Sv\_L,均可特异性地扩增杨树桑黄 478 bp 和 651 bp 的 ITS 片段,而不扩增桑树桑黄的 ITS 片段,因而可用于两个桑黄近缘种的快速分子辨别.本研究为探讨桑黄孔菌属真菌的系统发育关系提供了参考,并为桑黄种间的准确辨别提供了一种有效的分子辅助手段.

**关键词:** 桑黄; 鉴别; 分类; 内转录间隔区; 特异性引物

**中图分类号:** Q949      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2019)04-0765-06

## Molecular identification of *Sanghuangporus* species *S. sanghuang* and *S. vaninii*

SONG Ji-Ling<sup>1</sup>, LU Na<sup>1</sup>, WANG Wei-Ke<sup>1</sup>, YUAN Wei-Dong<sup>1</sup>, LI Hai-Bo<sup>2</sup>,  
CHENG Jun-Wen<sup>2</sup>, KANG Xue-Ping<sup>3</sup>, YAN Jing<sup>1</sup>

(1. Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China; 2. Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, China; 3. Yanbian Academy of Agricultural Sciences, Yanji 133001, China)

**Abstract:** For accurate identification of three relative *Sanghuangporus* species including *S. sanghuang*, *S. vaninii* and *S. baumii*, the phylogenetic analysis and molecular recognition of relative *Sanghuangporus* species were performed based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence of the ribosome rDNA. NJ phylogenetic tree indicated that 23 *S. sanghuang* strains, 11 *S. vaninii* strains and 6 *S. baumii* strains formed three independent clades with a high bootstrap support rate, and the obvious differences among the three relative species were presented. Based on the difference in rDNA ITS sequence alignment of *S. sanghuang* and *S. vaninii*, two pairs of primers, Sv\_U1/Sv\_L and Sv\_U2/Sv\_L, were designed, which can specifically amplify two ITS fragments of 478 bp and 651 bp only from *S. vaninii*, but not from *S. sanghuang*, indicating that this method can be effectively used for the molecular recognition of the two relative *Sanghuangporus* species. This study provides the evidence for the phylogenetic

收稿日期: 2018-07-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501815); 浙江省食用菌新品种选育项目(2016C02057-8); 杭州市财政(2017HNCX-03)

作者简介: 宋吉玲(1986-),女,吉林临江人,硕士生,主要从事食用菌栽培与育种. E-mail: songjiling860605@163.com

通讯作者: 王伟科. E-mail: akeak@126.com

relationship of *Sanghuangporus* genus, and an effective molecular assisted tool for the precise recognition of relative *Sanghuangporus* species.

**Keywords:** *Sanghuangporus*; Identification; Taxonomy; ITS; Specific primers

## 1 引言

桑黄是一种珍贵的多年生大型药用真菌,隶属于真菌界 Fungi、担子菌门 Basidiomycota、伞菌纲 Agaricomycetes、锈革孔菌目 Hymenochaetaceae、锈革孔菌科 Hymenochaetaceae、桑黄属 *sanghuangporus*,因其生长在桑属(*Morus*)植物上且子实体呈黄褐色而得名<sup>[1,2]</sup>。在《药性论》、《本草纲目》和《神农本草经》等历代本草著作中均有桑黄及其药效的明确记载<sup>[3,4]</sup>。现代研究表明,桑黄具有显著的抗肿瘤、抗氧化、增强免疫力和消炎抗菌等作用,是国际公认的生物抗癌天然产品<sup>[5,6]</sup>,已成为国内外医药制剂和保健品行业研发的热点。

目前报道的桑黄属真菌有 12 种,其中 7 个种在中国有分布,分别为高山桑黄 *S. alpinus*、暴马桑黄 *S. baumii*、小孔忍冬桑黄 *S. lonicericola*、桑树桑黄 *S. sanghuang*、杨树桑黄 *S. vaninii*、锦带花桑黄 *S. weigelae* 和环区桑黄 *S. zonatus*<sup>[4]</sup>。此类真菌的子实体均呈马蹄形,只是在形态特征和颜色上存在细微差别,仅仅依赖这些形态特征很难准确鉴定菌株的分类归属<sup>[7]</sup>。尤其是对野外采集标本的鉴定上,由于桑黄子实体颜色常常易受环境因子、子实体生长期等的影响而导致主观判断出现偏差。对于长期保藏的干标本,仅凭子实体形态特征与颜色更是难以准确区分。因此,利用分子技术手段辅助鉴定桑黄真菌具有重要意义。

真菌核糖体基因 rDNA 的转录间隔区(Internal Transcribed Spacers, ITS)序列由于进化速率快、稳定性好和丰富的信息位点,被广泛应用于真菌的系统发育分析和物种间的分子鉴定研究<sup>[8-11]</sup>。在本研究中,我们对收集的 36 个桑黄菌株进行 ITS 测序,基于桑树桑黄、杨树桑黄和暴马桑黄的 ITS 序列进行系统发育树构建,为深入探讨桑黄孔菌属的系统发育关系提供证据;并进一步通过 ITS 序列数据的比对分析,设计 ITS 特异引物,为桑黄真菌的种间辨别提供可靠便捷的分子辅助手段。

## 2 材料与方法

### 2.1 供试材料

供试菌株共 36 个,其中 23 个收集自我国各主

要保藏单位和栽培地区,13 份采集自浙江杭州地区。菌种保存于杭州市农业科学研究院(表 1)。

表 1 用于本研究的 36 个供试桑黄菌株

Tab. 1 Thirty-six *Sanghuangporus* strains used in this study

序号 Number	菌株编号 Strain Number	来源 Source
1	SH1	采集于桐庐保安,杭州
2	SH2	采集于桐庐后岩,杭州
3	SH3	采集于临安,杭州
4	SH4	采集于淳安,杭州
5	SH5	采集于桐庐凤川,杭州
6	SH6	采集于淳安临歧,杭州
7	SH7	采集于淳安临歧,杭州
8	SH8	采集于淳安梓桐,杭州
9	SH9	采集于淳安梓桐,杭州
10	SH10	采集于淳安姜家,杭州
11	SH11	采集于衢州开化,杭州
12	SH12	采集于淳安,杭州
13	SH13	采集于淳安,杭州
14	SH14	引进于淳安微生物研究所
15	SH15	引进于淳安微生物研究所
16	SH16	引进于四川省农业科学研究院
17	SH17	引进于韩国
18	SH18	引进于延边特产研究院
19	SH19	引进于福建农业大学
20	SH20	引进于福建农业大学
21	SH21	引进于福建农业大学
22	SH22	引进于福建农业大学
23	SH23	引进于中国农业微生物菌种保藏中心
24	SH24	引进于中国农业微生物菌种保藏中心
25	SH25	引进于四川省农业科学研究院
26	SH26	引进于吉林
27	SH27	引进于黑龙江伊春
28	SH28	引进于丽水市农业科学研究院
29	SH29	引进于安徽
30	SH30	引进于安徽
31	SH31	引进于安徽
32	SH32	引进于六安,安徽
33	SH33	引进于安徽
34	SH34	引进于浙江工业大学
35	SH35	引进于延边特产研究院
36	SH36	引进于福建

## 2.2 方法

2.2.1 菌丝体培养 所有供试菌株转接于PDA平板。在PDA平板上培养7d的菌落边缘取2mm×2mm的菌丝块,接种于PDA液体培养基中,在27℃培养10d,收集菌丝,无菌水漂洗两次,用无菌滤纸吸干水分,于-80℃保存备用。

2.2.2 基因组DNA提取 取0.5g菌丝体,采用新型快速植物基因组DNA提取试剂盒(BioTeke,北京)提取DNA。提取后的DNA经NanoDrop™2000(Nanodrop Technologies, South Logan, Utah, USA)测定浓度,并经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,于-20℃保存备用。

2.2.3 rDNA ITS扩增 20μL ITS-PCR扩增反应体系为:2×TSINGKE Master Mix 10μL, ITS引物对<sup>[12]</sup>各1μL, 20ng·μL<sup>-1</sup>模板DNA 3μL, ddH<sub>2</sub>O 5μL。扩增反应在Life ECO型扩增仪(Bioer,杭州博日科技)上进行,94℃预变性6min后;94℃变性40s,54.8℃退火40s,72℃延伸2min,共30个循环;最后于72℃补平7min,终止温度为4℃。

2.2.4 rDNA ITS序列的克隆和测序 采用普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(TIANGE,北京天根)从1.5%的琼脂糖凝胶中回收ITS片段。ITS片段与pGEM-Teasy载体连接,4℃过夜。连接产物转化于大肠杆菌感受态细胞DH5α中,经蓝白斑筛选后,每个样品均随机挑选5个阳性克隆交付杭州擎科生物技术公司完成测序。

2.2.5 系统发育分析 36个本次测序的ITS序

列连同16个从GenBank下载的ITS序列,共52个序列用于系统发育分析。16个ITS序列为戴玉成等<sup>[13]</sup>发表的桑黄属真菌基源物种(*S. sanghuang*、*S. vaninii*和*S. baumii*)的rDNA序列,包括*S. sanghuang*序列6个(Accession nos. AF534064.1、JN642576.1、JN642577.1、JN642586.1、JN642589.1和JN794061.1)、*S. vaninii*序列4个(Accession nos. HM584811.1、HM584811.1、JN642591.1和JN642593.1)、*S. baumii*序列6个(Accession nos. HM584807.1、JN642565.1、JN642567.1、JN642568.1、JN642570.1和JX069836.1)。

采用Clustal X v. 1.8<sup>[14]</sup>对52个ITS序列进行多重对位排列(multiple alignments)。用MEGA v. 5.0<sup>[15]</sup>进行系统发育分析,以Kimura 2-parameter模型计算遗传距离,所有对位排列结果中的空位作完全删除处理。用NJ法(Neighbor-joining method)构建系统进化树,Bootstrap testing为1000 replicates。

2.2.6 ITS特异引物设计与PCR扩增 根据桑黄真菌*S. sanghuang*和*S. vaninii*的ITS序列比对结果,设计可用于鉴别*S. sanghuang*和*S. vaninii*的ITS特异引物。引物设计采用Oligo 6.54软件(MBI, USA),引物合成由杭州擎科梓熙生物技术有限公司完成。利用ITS特异引物对桑黄真菌的PCR扩增参照“1.4 rDNA ITS扩增”。通过逐步提高PCR反应的退火温度,取得对ITS特异引物对扩增的最佳退火温度(表2)。

表2 辨别*S. sanghuang*与*S. vaninii*的ITS引物序列及其最适退火温度

Tab. 2 Sequence of ITS primers used for distinguishing *S. sanghuang* from *S. vaninii* and its optimal annealing temperature

ITS引物 ITS primer	序列 Sequence(5'-3')	退火温度 Annealing temperature(°C)	扩增 <i>S. vaninii</i> 的片段 Amplified fragment from <i>S. vaninii</i> (bp)
Sv_U1	GAGTGCCTCGGGTGAAGACT	54.8	<i>S. vaninii</i> (478)
Sv_L	AGGAGGTAACAACAACCTCTT		
Sv_U2	TGCGCATGTGCACGGCCTT	54.8	<i>S. vaninii</i> (651)
Sv_L	AGGAGGTAACAACAACCTCTT		

注:字母U和L分别代表上、下游ITS特异引物,字母Sv代表杨树桑黄

Note: The letters U and L refer to the specific upstream and downstream primer for the ITS region, respectively. The letter Sv refer to *S. vaninii*

## 3 结果与分析

### 3.1 基于rDNA ITS序列的系统发育分析

基于52个桑黄属真菌的ITS序列对位形成的数据集(Dataset)总共包含了744个碱基位点,

其中保守位点(conserved)370个,变异位点(variable)337个,简约信息位点(parsimony informative)104个,单突变位点(singleton)226个。NJ系统发育树(图1)显示,49个菌株构成了3个独立的类群Group I、Group II和Group III,分别包含了

29 个 *S. sanghuang* 菌株(供试菌株 SH1~SH23)、14 个 *S. vaninii* 菌株(供试菌株 SH24~SH33)、6 个 *S. baumii* 菌株和 3 个桑黄真菌以外的菌株(供试菌株 SH34~SH36, 分别为 *Sanghuangporus spp.*, *Cordyceps militaris* 和 *Trametes hirsuta*), Group I、Group II 和 Group III 的 Bootstrap 支持率分别为 99%、99% 和 98%。这表明 *S. sanghuang*、*S. vaninii* 和 *S. baumii* 这三个桑黄真菌的种间存在明显差异, 且 *S. sanghuang* 与 *S. vaninii* 的亲缘关系较 *S. baumii* 接近。这与形态特征上三种真菌的存在的些许差别、以及寄生树种的不同具有一致性。

### 3.2 ITS 特异引物设计

对 6 个 *S. vaninii* 菌株(SH24、SH26、SH27、SH28、SH30、SH32) 和 6 个 *S. sanghuang* 菌株(SH1、SH2、SH14、SH16、SH18、SH23) 测序获得的 12 个 ITS 序列经多重对位排列产生了 820 个碱基位点。根据对位碱基位点的差异比较, 设计出了可特异性扩增 *S. vaninii* 菌株而不扩增 *S. sanghuang* 的两对 ITS 引物 Sv\_U1/Sv\_L 和 Sv\_U2/Sv\_L。图 2 显示了上游引物 Sv\_U1 所在的第 241~300 位点区段、上游特异引物 Sv\_U2 所在的第 1~60 位点区段, 以及下游引物 SS\_L 所在的第 721~780 位点区段。两对 ITS 特异引物的碱基序列、退火温度及扩增的 ITS 片段长度详见表 2。

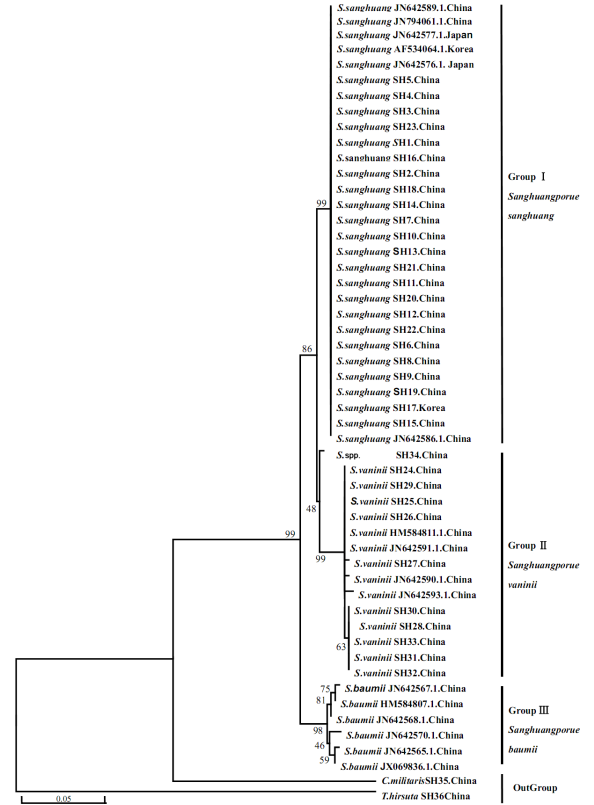


图 1 基于桑黄属真菌 rDNA ITS 序列构建的系统发育树 采用 Kimura two-parameter distance mode; 完全删除; bootstrap=1000; 节点数值代表 bootstrap 值(低于 50 的数值不显示)

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree generated for *Sanghuangporus* species based on rDNA ITS sequences

Nucleotide; Kimura two-parameter distance model, complete deletion, bootstrap=1000; the numbers in each node represent bootstrap support values (those lower than 50 are not shown).



图 2 辨别 *S. sanghuang* 与 *S. vaninii* 的 ITS 特异引物位点, 箭头所指分别为上下游引物 Sv\_U1、Sv\_U2 和 Sv\_L

Fig. 2 Localization and specificity of the specific ITS primers used for distinguishing *S. sanghuang* from *S. vaninii*. The upstream and downstream primers (Sv\_U1, Sv\_U2 and Sv\_L) are indicated by arrows in the sequence

### 3.3 *S. sanghuang* 与 *S. vaninii* 的分子鉴别

分别以 10 个 *S. vaninii* 菌株和 23 个 *S. sanghuang* 菌株的基因组 DNA 为模板, 以表 2 所示的 ITS 特异引物对进行 PCR 扩增。在最适退火温度下, 两对特异引物 Sv\_U1/Sv\_L 和 Sv\_U2/Sv\_L 分别从 10 个 *S. vaninii* 菌株中扩增出了唯一的一

条 ITS 条带, 长度分别为 478 bp 和 651 bp, 而没有从 23 个 *S. sanghuang* 菌株中扩增出任何条带(图 3)。这一结果表明, 本研究基于 *S. vaninii* 和 *S. sanghuang* 的 ITS 序列差异设计的两对特异引物可以用于 *S. vaninii* 与 *S. sanghuang* 的分子鉴别。

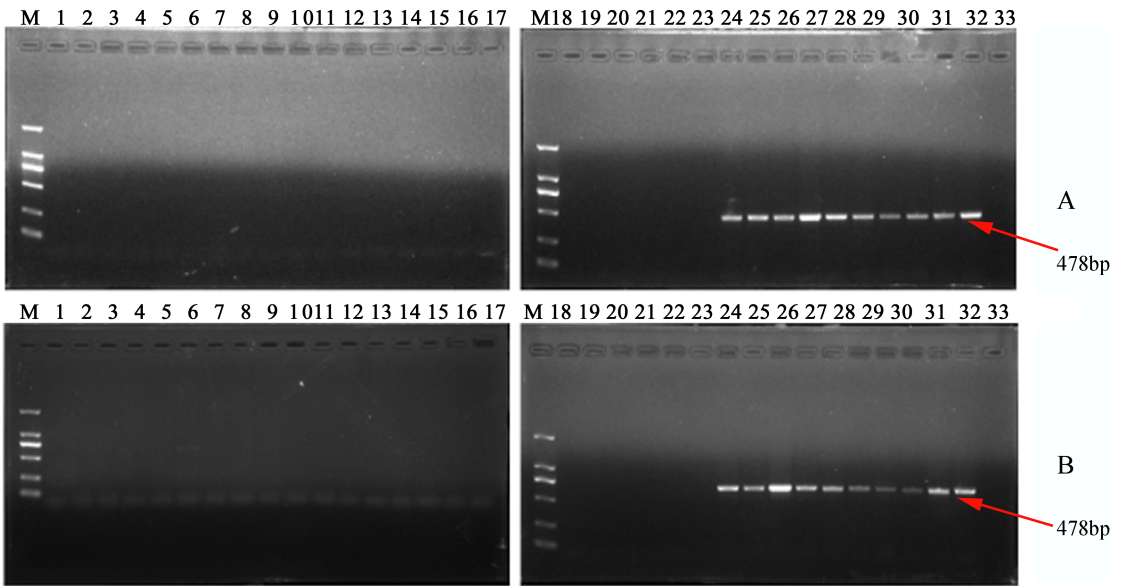


图3 *S. sanghuang* 与 *S. vaninii* 菌株的 ITS 特异引物扩增图谱

A; Sv\_U1/Sv\_L; B; Sv\_U2/Sv; M; DNA 分子量标准; 白色箭头所指为目的条带; 泳道 1~23 对应表 1 所列的桑黄菌株 SH1~23; 泳道 24~33 对应表 1 所列的杨黄菌株 SH24~33

Fig. 3 The PCR amplification pattern of *S. sanghuang* and *S. vaninii* strains with specific ITS primers A; Sv\_U1/Sv\_L; B; Sv\_U2/Sv; M; DNA marker; The white arrow shows the location of target band; Lanes 1~23 and Lanes 24~33 correspond to the *S. sanghuang* strains SH1~23 and the *S. vaninii* strains SH24~33 listed in Table 1, respectively.

## 4 讨论

随着分子生物学技术的发展,位于 18S rDNA 及 28S rDNA 间的 rDNA 内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列分析技术由于进化速率快、稳定性好和测序方便,已广泛运用到多种真菌种属水平的分类鉴定及遗传多样性的研究<sup>[16-19]</sup>。利用 ITS 序列分析技术,我们鉴定了杭州、衢州及安徽等地采集到的 36 个桑黄样品,根据 ITS 序列聚类分析,将 36 个桑黄样品明显区分为 3 个类群。其中,杭州地区采集的 23 个桑黄菌株为一组,为 *S. sanghuang*, 序列长度 814 bp; 收集于吉林、四川等地的 10 个桑黄菌株为一组,为 *S. vaninii*, 序列长度为 773 bp; 其余的 3 个菌株为一组,为 *sanghuangporus* 以外的其他菌株。

核糖体基因 rDNA ITS 区段的序列差异比较被广泛用于近缘物种的辨别。在实际应用中,通常需要 ITS 区段的克隆测序和序列的同源性比对,比较耗时耗力。通过 ITS 特异引物设计,使得近缘物种的差异直观地表现为 ITS 特异扩增条带的有无,可非常便捷地辨别近缘物种,例如美味牛肝菌 *Boletus edulis* Bull. 与铜色牛肝菌 *B. aereus* Bull.、褐红牛肝菌 *B. pinophilus* Pilát & Dermek、夏生牛肝菌 *B. aestivalis* (Paulet) Fr.<sup>[20,21]</sup>、

牛肝菌属卷边组 *Boletus* sect. *Appendiculati* 物种<sup>[10]</sup>、以及松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 与拟松材线虫 *B. mucronatus* 伪伞真滑刃线虫 *B. fraudulentus* 等<sup>[22]</sup>。本文通过 ITS 特异引物的开发,可以进一步从 PCR 电泳图上直观地反映了两个相似种在基因组上的差异,也验证了 ITS 特异引物用于 *S. vaninii* 与 *S. sanghuang* 分子鉴定的可靠性。该技术手段适用于野外采集的新鲜样本、陈年保存的干标本、古老标本或菌丝体样本,对于仅含有微量 DNA 的样本也可以快速完成鉴别。

在研究过程中发现,由于 *S. sanghuang* 与 *S. vaninii* 的 ITS1-5.8S-ITS2 序列分别为 773 bp 和 814 bp, 两者的 ITS 序列差异很小,很难设计出用于鉴定 *S. sanghuang* 的特异引物,因此,进一步设计用于鉴定 *S. sanghuang* 的特异引物也是今后值得尝试的技术思路。此外,在本研究的基础上,我们将收集更多的桑黄种质资源,包括暴马桑黄 *S. baumii*、大孔忍冬桑黄 *S. lonicerinus* 和小孔忍冬桑黄 *S. lonicericola* 等,进一步开发 ITS 特异引物用于更多相似种间的分子识别,为桑黄真菌各物种的准确鉴别提供可靠便捷的分子技术手段。

## 参考文献:

[1] 张小青,戴玉成. 中国真菌志 [M]. 北京:科学出版

- 社, 2005:117.
- [2] Zhou L W, Vlasák J, Decock C, *et al.* Global diversity and taxonomy of the *Inonotus linteus* complex (Hymenochaetales, Basidiomycota); *Sanghuangporus* gen. nov., *Tropicoporus excentrodendri* and *T. guanacastensis* gen. et spp. nov., and 17 new combinations [J]. *Fungal Divers*, 2016, 1: 335.
- [3] 孙培龙, 徐双阳, 杨开, 等. 珍稀药用真菌桑黄的国内外研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2006, 33: 119.
- [4] 吴声华, 黄贯中, 陈愉瓶, 等. 桑黄的分类及开发前景 [J]. *菌物研究*, 2016, 14: 187.
- [5] 朱琳, 崔宝凯. 药用真菌桑黄的研究进展 [J]. *菌物研究*, 2016, 14: 201.
- [6] 梁晓薇, 刘远超, 黄龙花, 等. 桑黄孔菌属的研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2017, 37: 98.
- [7] 戴玉成, 崔宝凯. 药用真菌桑黄种类研究 [J]. *北京林业大学学报*, 2014, 36: 1.
- [8] 张文娟, 康帅, 魏锋, 等. 基于 ITS 序列分析鉴别冬虫夏草与古尼虫草 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35:1551.
- [9] 李莹, 李莉, 刘艳玲, 等. 基于 ITS 序列分析对杏鲍菇菌种的鉴定 [J]. *微生物学杂志*, 2014, 34: 62.
- [10] 魏海龙, 李海波, 王丽玲, 等. 牛肝菌属卷边组 *Boletus sect. Appendiculati* 物种的分子识别 [J]. *菌物学报*, 2014, 3: 242.
- [11] 黄丽洋, 石卉, 王晓婷, 等. 野生桑黄菌株的分离、鉴定和次生代谢物分析 [J]. *中草药*, 2013, 44: 3394.
- [12] White T J, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]// Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, *et al.* PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990: 315.
- [13] Tian X M, Yu H Y, Zhou L W. Phylogeny and taxonomy of the *Inonotus linteus* complex [J]. *Fungal Divers*, 2013, 58: 159.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876.
- [15] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28: 2731.
- [16] 谢丽源, 张勇, 彭金华, 等. 桑黄真菌分子鉴定及遗传多样性分析 [J]. *菌物学报*, 2010, 29: 347.
- [17] Lim Y W, Lee J S, Jung H S. Type studies on *Phellinus baumii* and *Phellinus linteus* [J]. *Mycotaxon*, 2003, 85: 201.
- [18] 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: 0584.
- [19] 张文隽, 吴亚召, 雷萍, 等. 秦巴山区野生桑黄 rDNA ITS 序列及亲缘关系分析 [J]. *中国食用菌*, 2015, 34: 50.
- [20] Mello A, Ghignone S, Vizzini A, *et al.* ITS primers for the identification of marketable boletes [J]. *J Biotechnol*, 2006, 121: 318.
- [21] Lian B, Zang J P, Hou W G, *et al.* PCR-based sensitive detection of the edible fungus *Boletus edulis* from rDNA ITS sequences [J]. *Electronic J Biotechnol*, 2008, 11: 1.
- [22] Filipiak A, Wiczorek P, Tomalak M. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection and identification of *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and *B. fraudulentus*-three closely related species within the *xylophilus* group [J]. *Nematology*, 2017, 19: 1.

#### 引用本文格式:

- 中文: 宋吉玲, 陆娜, 王伟科, 等. 桑树桑黄与杨树桑黄的分子辨别 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2019, 56: 765.
- 英文: Song J L, Lu N, Wang W K, *et al.* Molecular identification of *Sanghuangporus* species *S. sanghuang* and *S. vaninii* [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 765.