

植病生防菌盾壳霉的分子生物学研究进展

张 姝^{1*} 张永杰^{2,3}

- (1. 山西大学应用化学研究所 太原 030006)
(2. 山西大学生命科学与技术学院 太原 030006)
(3. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘 要: 盾壳霉是一种重要的核盘菌寄生菌。近年来, 该菌在分子水平的研究取得了一定的进展。本文概述了盾壳霉在产孢调控、与核盘菌互作、遗传转化以及动态检测和遗传多样性等方面的研究现状, 并对研究中存在的问题进行了讨论。希望在此基础上能够促进该菌分子生物学研究的不断深入, 更好地开发利用该菌的基因资源。

关键词: 盾壳霉, 生防菌, 分子生物学

Advances on the Molecular Biology of *Coniothyrium minitans*, an Important Biocontrol Agent of *Sclerotinia sclerotiorum*

ZHANG Shu^{1*} ZHANG Yong-Jie^{2,3}

- (1. Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006)
(2. College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006)
(3. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: *Coniothyrium minitans* Campbell is a ubiquitous antagonistic fungus of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, which is an important widespread plant pathogen. Many researches indicated that *C. minitans* had great potential in controlling *Sclerotinia* diseases caused by *Sclerotinia* spp. in green houses and fields. In recent years, there have been crucial advances for this fungus at the molecular level. In order to promote further research, the present advancement on the molecular biology of conidiation, interaction with host, transformation, detection and genetic diversity are summarized and existing problems are discussed.

Keywords: *Coniothyrium minitans*, Biocontrol agent, Molecular biology

盾壳霉(*Coniothyrium minitans* Campbell)是1947年发现的一种重要的菌核寄生菌。在核盘菌的众多生防菌中, 盾壳霉由于具有分布广泛、专一性强、作用时间长、对植物无致病性等特点, 被公认为最具开发潜力的生防菌之一。欧洲市场上已有两种盾壳霉制剂出售^[1]。近年来, 国内外有关盾壳霉的研究广泛而深入, 尤其是分子生物学方面的研究已

经逐步展开, 并呈现出迅速发展的好势头。作者于2004年曾就盾壳霉的研究进行过总结, 但当时分子水平的研究还很少^[2]。本文分别从产孢调控、与核盘菌相互作用、遗传转化、动态检测和遗传多样性等方面对盾壳霉分子水平的研究进展进行总结。希望在此基础上能够促进盾壳霉研究的不断深入, 同时, 能为其它相似真菌体系的研究提供借鉴之处。

1 盾壳霉产孢调控的分子基础

分生孢子是盾壳霉在土壤中存活的主要形式、传播的重要媒介和商业制剂中的主要成分,在盾壳霉的开发应用中具有重要的意义。然而,以前的研究多集中在促进产孢的环境因素方面,对产孢的分子基础并不清楚。Li等从构建的ATMT突变库中筛选到98个产孢缺陷突变体。与野生型菌株相比,突变体除产孢能力缺失外,还在菌落形态、菌落色素或菌核致病力等方面表现出差异。在突变体ZS-1T1000中发现被破坏的基因编码MAP激酶^[3],这暗示着盾壳霉产孢是涉及信号传导的复杂过程。在另一突变体ZS-1T2029中发现被破坏的基因为CMCPS1(氨基甲酰磷酸合成酶基因),该基因编码产物是鸟氨酸循环中的关键酶。当培养基中添加外源L-精氨酸或者硝普钠(NO供体)时,该突变体可恢复产孢;而在存在NG-硝基-L-精氨酸甲酯(NO合成酶抑制剂)时,野生型菌株产孢受到抑制。由此推测,CMCPS1的破坏阻断了L-精氨酸(NO合成酶的底物)的生物合成,后者进而影响了NO的产生,最终导致不能正常产孢^[4]。这种产孢介导方式在真菌中尚属首次报道。然而,真菌的产孢受到光照、营养、空气、温度和次生代谢物等因素的综合影响,这必然涉及众多生化途径的调控,是一个非常复杂的过程。我们相信随着研究的深入一定还会有更多产孢相关基因被陆续发现。

2 盾壳霉与核盘菌互作的分子基础

盾壳霉在土壤中通常呈休眠状态,只有在遇到菌核时或在被核盘菌侵染的植物病组织上才有活性。那么,盾壳霉是怎样识别寄主的呢?Smith等研究了盾壳霉分生孢子和幼嫩菌丝与凝集素的亲合性以及孢子表面的疏水性和静电荷,认为这些特性可能在盾壳霉与寄主的早期识别和结合中起作用^[5,6]。在盾壳霉基因组中含有与*Magnaporthe grisea*中*PTH11*类似的基因^[7]。该基因编码产物为一种膜蛋白,在*M. grisea*中可以感知物体表面特性,进而介导附着胞的分化^[8]。该蛋白编码序列的存在暗示着它可能在盾壳霉与核盘菌的识别过程中起作用。

盾壳霉对核盘菌的作用方式主要包括寄生作用、抗生素作用和溶菌作用^[2]。Phillips和Price认为盾壳霉在寄生核盘菌菌核和菌丝体过程中,存在着机

械压力和酶解两种作用途径^[9]。目前,已经知道葡聚糖酶和几丁质酶在寄生菌核过程中发挥着非常重要的作用。此外,在盾壳霉发酵液中还可检测到木聚糖酶和纤维素酶活性^[10]。Giczey等从盾壳霉中克隆了一个外切 β -1,3-葡聚糖酶基因(*cmgI*),且在酿酒酵母中表达的重组酶对核盘菌菌丝生长有抑制作用;在寄生菌核过程中,该基因的表达水平提高^[11]。Laroche等从盾壳霉中克隆到一个木聚糖酶基因*cxyI*(美国专利6121034),并在毕赤酵母中得到表达^[12]。此外,Laroche等和Giczey等还曾分别报道过一种外切 β -1,3-葡聚糖酶基因*cbegI*(美国专利6734344)和一个几丁质酶基因CH1(GenBank登录号AF285086)。

盾壳霉对菌核的寄生是一个复杂的涉及众多生化反应的过程。Muthumeenakshi等通过构建SSH-cDNA文库鉴定出与盾壳霉寄生菌核过程相关的251个非冗余EST序列,涉及信号传导与细胞通讯、寄主细胞壁的降解与能量消耗、抗微生物代谢产物和毒素的合成、营养利用、解毒和胁迫应答以及一些功能未知基因等^[7]。在细胞壁降解相关酶类中,既有 β -葡聚糖酶、 α -葡聚糖酶和几丁质酶,也有 α -L-鼠李糖酶、甘露糖酶、木聚糖酶、乙酰木聚糖酯酶及肽酶^[7]。 β -葡聚糖酶中,已发现有内切-1,3和-1,4葡聚糖酶,以及外切-1,3和-1,4葡聚糖酶; α -葡聚糖酶中,已发现有内切-1,3葡聚糖酶,以及外切-1,3、-1,4和-1,6葡聚糖酶。这种降解酶种类的多样性,在一定程度上暗示了它们在寄生菌核过程中的协同作用。此外,Roger等从4000个突变体中筛选到9个对核盘菌菌核的致病性降低或丧失的突变体^[13],但未分离突变体中被破坏的基因。

核盘菌分泌的草酸是其侵染寄主植物时的主要致病因子之一。研究发现盾壳霉可以降解草酸,并且草酸的降解与 β -1,3葡聚糖酶的产量与活性呈正相关;而该酶的产生在一定范围内与环境pH呈正相关。这可能意味着草酸的降解适当提高了环境pH,进而诱导了 β -1,3葡聚糖酶的产生,提高了该酶的活性^[14]。

长期以来,人们普遍认为盾壳霉对核盘菌只存在寄生作用,而不存在抗生素作用^[15]。导致这种误判的原因可能是因为抗生物质的产生受到菌株、环境pH和营养因子等的影响^[16,17]。盾壳霉可以产生抗菌和抗真菌的次生代谢产物^[18,19]。目前,已从盾壳

霉培养滤液中鉴定出至少 3 类代谢物质: 3(2H)-苯并呋喃酮类, 色烷类和 macrophelide A^[2]。Muthumeenakshi等从盾壳霉中发现许多与次生代谢产物合成相关的基因, 如聚酮类化合物合成通路相关基因, epipolythiodioxopiperazine 类(ETP)真菌毒素(如gliotoxin和sirodesmin)生物合成的基因簇^[7]。闫帅发现一个与抗真菌物质产生能力相关的基因(CMGPI-like 1), 其与曲霉(*Aspergillus fumigatus* Af293)的GPI(糖基磷脂酰肌醇)锚定蛋白有较高的同源性。该基因破坏后, 突变菌株除产抗真菌物质特性发生改变外, 在生长速度、产孢能力、寄生致病能力等方面跟出发菌株ZS-1相比也都产生了一定程度的差异, 说明盾壳霉中的GPI蛋白不仅对盾壳霉产抗真菌物质途径具有调控作用, 对其它途径也可能具有一定的调控作用^[20]。纵观目前的研究结果, 可以认为盾壳霉寄生菌核的过程可能涉及到机械压力、抗生物质和降解酶类的共同作用。

3 盾壳霉遗传转化的研究

在传统的真菌遗传分析中, 常用物理或化学方法诱导原始菌株产生突变, 然后分析突变菌株的特性。例如, 用紫外线照射盾壳霉的分生孢子, 可获得 β -葡聚糖酶活性提高的菌株^[21]。根据适应性变异和紫外线照射可获得抗农利灵和菌核净的菌株^[22,23]。然而, 常规方法获得的突变体均为随机突变, 要从获得的突变体中分离突变基因非常困难。

近年, 盾壳霉的DNA转化已经有了一定的进展。Jones等首先建立了菌株A69的PEG-CaCl₂原生质体转化方法, 获得潮霉素B抗性基因(*hph*)和 β -葡萄糖醛酸糖苷酶基因(*uidA*)共表达的突变株。突变体均为多拷贝整合、具有较高的遗传稳定性, 在培养形态、水势敏感性以及菌核寄生能力等特性方面与野生型相似^[24]。相比PEG-CaCl₂介导的原生质体转化, REMI和ATMT的转化频率和单拷贝整合事件都明显提高。Roger等使用REMI和ATMT分别转化菌株Conio的原生质体和分生孢子。REMI对原生质体的转化效率为常规原生质体转化方法的两倍。ATMT对萌发的分生孢子的转化效率高于未萌发的孢子; 未萌发的分生孢子高度黑化, 不适合直接用于ATMT转化。常规原生质体转化方法获得的转化子没有单拷贝整合, 而REMI和ATMT获得转化子中单拷贝整合的频率分别为 8%和 40%^[13]。Li 等使用

ATMT方法转化菌株ZS-1 的分生孢子, 构建了包含 3 万个转化子的突变体库。研究发现孢子成熟度影响转化效率, 用在PDA上培养 21 d的孢子进行转化时获得转化子的数目最多。获得的突变体中单拷贝插入的频率达到 82.7%, 并且筛选到四种类型的突变体(产孢缺陷突变体、致病缺陷突变体、色素改变突变体和抗生素缺陷突变体)^[3]。高频率单拷贝突变体的获得为相关基因的克隆和功能研究提供了很大的便利。除此之外, 绿色荧光蛋白作为一种重要的报告基因, 在病原菌与寄主的互作及对环境微生物的监测等诸多方面均显示了良好的应用前景, 然而迄今还未用于转化盾壳霉。

4 盾壳霉定殖的动态检测

研究群体动态常常需要使用特殊的选择性标记物或特殊的菌株。利用农利灵抗性菌株SV-5-2并用含农利灵、青霉素和链霉素的选择培养基可以检测油菜花瓣上^[25]或土壤中的盾壳霉^[26]。Jones等用构建的含潮霉素B抗性基因的突变体研究盾壳霉的存活和对菌核的侵染, 发现潮霉素B抗性可以区分土壤中的突变体和自然菌株, 也能用于从腐烂菌核中分离盾壳霉^[27]。然而, 用传统分离培养的方法比较费时。Ridgway和Stewart用为菌株A69设计的PCR检测方法, 可以特异研究该菌株在土壤中的生态学^[28], 但还做不到准确定量。如果能够建立实时定量PCR检测体系, 将有助于准确评估盾壳霉在环境中的菌量变化。

5 盾壳霉遗传多样性研究

盾壳霉的不同菌株在菌落形态、色素颜色、分生孢子器的大小、多少及着生方式, 寄生致病菌核能力等方面存在明显差异。根据这些特征, 许多学者分别将采集的菌株分为不同的菌落类型^[29-31]。然而, 这些基于形态特征的划分容易受到环境条件的影响, 无法作为鉴定菌株的稳定特征, 而分子标记被证明是分析遗传多样性的有利工具。Grendene等发现AFLP、RAPD和形态生理特征均可区分供试的 8 个菌株, 3 种方法之间没有紧密的对应关系, 但AFLP法较RAPD法和形态生理特征分析对检测盾壳霉种内变异和田间动态更有效、更可靠^[32]。Muthumonakshi等对代表 8 种菌落类型的 48 个菌株进行SSR-PCR和ITS序列分析, 结果表明盾壳霉菌

株间多态性水平相对较低, 菌落类型或其它特性与 SSR-PCR 或 ITS 分析之间没有必然的联系^[33]。Goldstein发现盾壳霉菌株之间RAPD图谱存在差异, 且菌株A69 有一条 1.4 kb的特异条带。测序发现该条带含有两个 114 bp的重复片段和一些 8 bp~11 bp的短重复序列。从该段序列设计引物进行扩增可以得到A69 特异的图谱^[34]。

6 其他

程家森等和周浩等从盾壳霉中发现一种 totiviridae科的双链RNA真菌病毒(CmRV)。它可以通过无性繁殖传递给子代, 但菌株间的传递受到营养亲和性的限制^[35]; 它对寄主不产生明显影响^[36]。Dihya和Nigam从盾壳霉中纯化到一种漆酶, 具有潜在工业应用价值^[37]。Lu等将盾壳霉的木聚糖酶基因 *cxy1* 用ATMT法成功转入拟南芥, 得到 2 个表达 *cxy1* 的突变株, 为研究植物对核盘菌的抗病机制奠定了基础^[38]。盾壳霉可以在较高pH条件下生长(pH 2-12), 因此, 克隆其耐碱相关基因可以为构建耐盐碱的作物提供基因材料。张祿从构建的突变体库中筛选到四个耐碱缺陷型突变体(在pH 9 的培养基中无法生长), 但没有克隆到相应的基因^[39]。

7 展望

近 30 年来, 关于盾壳霉的研究多集中在生物学、生态学、生防机制以及发酵和应用等方面。直到最近几年才在分子水平进行研究, 但多角度广泛开展研究并在某些方面具有很强的启示性。例如, 盾壳霉与核盘菌互作关系的研究可以为研究其它真菌-真菌相互作用提供很好的借鉴。虽然以前曾在 *Aspergillus nidulans*中报道过L-精氨酸对产孢的促进作用^[40], 但在盾壳霉中首次分析了L-精氨酸调控产孢的途径, 即通过著名的信号分子NO对产孢进行调节。这提高了我们对其它真菌产孢调控的认识。

然而, 目前也还存在许多有待加强研究的问题。例如, 虽然早就研究了盾壳霉与凝集素的结合特性, 并且知道盾壳霉只在接触寄主真菌时才表现活性, 但凝集素在盾壳霉与核盘菌早期识别中的作用尚不清楚, 也没有对凝集素进行纯化或克隆。虽然鉴定了盾壳霉中许多与寄主体壁降解相关的酶的序列, 但起最主要作用的酶是什么并不明确。对于

盾壳霉的遗传改造, 目前只是对遗传转化方法进行了探索; 而从自然界分离的野生菌株很难直接满足生产和应用的要求, 因而对盾壳霉进行遗传改良具有重要意义。相信随着分子生物学研究的不断深入, 盾壳霉将可以得到更好地开发和利用。

参考文献

- [1] 张 姝, 韩巨才. 植病生防菌小盾壳霉的两种商品制剂. 农药, 2007, **46**(12): 846-847, 856.
- [2] 张永杰, 高俊明, 韩巨才, 等. 植病生防菌盾壳霉的研究进展. 中国生物工程杂志, 2004, **24**(11): 18-21.
- [3] Li MX, Gong XY, Zheng J, *et al.* Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **243**(2): 323-329.
- [4] Gong XY, Fu YP, Jiang DH, *et al.* L-Arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, **44**(12): 1368-1379.
- [5] Smith S, Armstrong R, Barker M, *et al.* Determination of *Coniothyrium minitans* conidial and germling lectin avidity by flow cytometry and digital microscopy. *Mycological Research*, 1999, **103**(12): 1533-1539.
- [6] Smith S, Chohan R, Armstrong R, *et al.* Hydrophobicity and surface electrostatic charge of conidia of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Mycological Research*, 1998, **102**(2): 243-249.
- [7] Muthumeenakshi S, Sreenivasaprasad S, Rogers CW, *et al.* Analysis of cDNA transcripts from *Coniothyrium minitans* reveals a diverse array of genes involved in key processes during sclerotial mycoparasitism. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, **44**(12): 1262-1284.
- [8] DeZwaan TM, Carroll AM, Valent B, *et al.* *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell*, 1999, **11**(10): 2013-2030.
- [9] Phillips AJL, Price K. Structural aspects of the parasitism of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Coniothyrium minitans* Campbell. *Phytopathologische Zeitschrift*, 1983, **107**(3): 193-203.
- [10] Kaur J, Munshi GD, Singh RS, *et al.* Effect of carbon source on production of lytic enzymes by the sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. *Journal of Phytopathology*, 2005, **153**(5): 274-279.
- [11] Giczey G, Kerenyi Z, Fulop L, *et al.* Expression of *cmg1*, an exo-beta-1,3-glucanase gene from *Coniothyrium minitans*, increases during sclerotial parasitism. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(2): 865-71.
- [12] Lu ZX, Huang TY, Frick MM, *et al.* Expression of the

- xylanase gene *cxy1* from *Coniothyrium minitans* in *Pichia pastoris*. The 2nd International Molecular Farming Conference, Lodon, Ontario, Canada, 1999, p.60.
- [13] Rogers CW, Challen MP, Green JR, *et al.* Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, **241**(2): 207–214.
- [14] Ren L, Li GQ, Han YC, *et al.* Degradation of oxalic acid by *Coniothyrium minitans* and its effects on production and activity of β -1,3-glucanase of this mycoparasite. *Biological Control*, 2007, **43**(1): 1–11.
- [15] Whipps JM, Gerlagh M. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological Research*, 1992, **96**(11): 897–907.
- [16] Yang R, Han YC, Li GQ, *et al.* Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by antifungal substances produced by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, **119**(4): 411–420.
- [17] Yang R, Han YC, Li GQ, *et al.* Effects of ambient pH and nutritional factors on antifungal activity of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Biological Control*, 2008, **44**(1): 116–127.
- [18] 姜道宏, 李国庆, 易先宏, 等. 盾壳霉所产抗细菌物质的特性. *植物病理学报*, 1998, **28**(1): 29–32.
- [19] McQuilken MP, Gemmell J, Whipps JM. Some nutritional factors affecting production of biomass and antifungal metabolites of *Coniothyrium minitans*. *Biocontrol Science and Technology*, 2002, **12**(4): 443–454.
- [20] 闫 帅. 盾壳霉 T-DNA 标记插入突变体 ZS-1T20440 特性研究及其产抗真菌物质相关基因克隆. 华中农业大学硕士学位论文, 2007.
- [21] Zantinge JL, Huang HC, Cheng KJ. Induction, screening and identification of *Coniothyrium minitans* mutants with enhanced β -glucanase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **32**(2): 224–230.
- [22] 缪华军, 李国庆. 盾壳霉抗杀菌剂 vinclozolin 的诱变及突变体的生防潜力. *中国生物防治*, 2006, **22**(1): 73–77.
- [23] 赵丽娟, 张永杰, 刘慧平, 等. 盾壳霉抗菌核净菌株的诱导及其特性初步研究. *农药学学报*, 2005, **7**(3): 233–236.
- [24] Jones E, Carpenter M, Fong D, *et al.* Co-transformation of the sclerotial mycoparasite *Coniothyrium minitans* with hygromycin B resistance and β -glucuronidase markers. *Mycological Research*, 1999, **103**(8): 929–937.
- [25] Yang L, Miao HJ, Li GQ, *et al.* Survival of the mycoparasite *Coniothyrium minitans* on flower petals of oilseed rape under field conditions in central China. *Biological Control*, 2007, **40**(2): 179–186.
- [26] 缪华军. 盾壳霉抗杀菌剂农利灵突变菌株的获得、特性及其应用研究. 华中农业大学硕士学位论文, 2004.
- [27] Jones EE, Stewart A, Whipps JM. Use of *Coniothyrium minitans* transformed with the hygromycin B resistance gene to study survival and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia in soil. *Mycological Research*, 2003, **107**(3): 267–276.
- [28] Ridgway HJ, Stewart A. Molecular marker assisted detection of the mycoparasite *Coniothyrium minitans* A69 in soil. *New Zealand Plant Protection*, 2000, **53**: 114–117.
- [29] Huang HC. Distribution of *Coniothyrium minitans* in Manitoba sunflower fields. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1981, **3**(4): 219–222.
- [30] Sandys-Winsch C, Whipps JM, Gerlagh Mea. World distribution of the sclerotial mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Mycological Research*, 1993, **97**(10): 1175–1178.
- [31] 姜道宏, 李国庆, 易先宏, 等. 菌核寄生菌盾壳霉的研究. 不同菌株培养特性及寄生致腐菌核能力的比较. *华中农业大学学报*, 1996, **15**(3): 229–232.
- [32] Grendene A, Minardi P, Giacomini A, *et al.* Characterization of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*: comparison between morpho-physiological and molecular analyses. *Mycological Research*, 2002, **106**(7): 796–807.
- [33] Muthumeenakshi S, Goldstein AL, Stewart A, *et al.* Molecular studies on intraspecific diversity and phylogenetic position of *Coniothyrium minitans*. *Mycological Research*, 2001, **105**(9): 1065–1074.
- [34] Goldstein AL, Carpenter MA, Crowhurst RN, *et al.* Identification of *Coniothyrium minitans* isolates using PCR amplification of a dispersed repetitive element. *Mycologia*, 2000, **92**(1): 46–53.
- [35] Cheng JS, Jiang DH, Fu YP, *et al.* Molecular characterization of a dsRNA totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. *Virus Research*, 2003, **93**(1): 41–50.
- [36] 周 浩. 盾壳霉 CmRV 基因组的全长 cDNA 克隆及转化 ZS-1 的研究. 华中农业大学硕士学位论文, 2007.
- [37] Dahiya JS, Nigam DSP. Characterisation of laccase produced by *Coniothyrium minitans*. *Journal of Basic Microbiology*, 1998, **38**(5–6): 349–359.
- [38] Lu ZX, Laroche A, Huang HC. Segregation patterns for integration and expression of *Coniothyrium minitans* xylanase gene in *Arabidopsis thaliana* transformants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2004, **45**(1): 23–31.
- [39] 张 禄. 盾壳霉耐碱缺陷型突变体的筛选及相关基因克隆的初步研究. 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2006.
- [40] Serlupi-Crescenzi O, Kurtz MB, Champe SP. Developmental defects resulting from arginine auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 1983, **129**(11): 3535–3544.