

研究报告

一种袋栽黑木耳共生菌的鉴定及其共生效应初步研究

宋婷婷 蔡为明* 金群力 范丽军 冯伟林 沈颖越

(浙江省农业科学院园艺研究所 浙江 杭州 310021)

摘要:【目的】研究袋栽黑木耳某种共生菌对黑木耳生长的影响。【方法】经分离纯化,以及形态学和分子系统学分析,鉴定该真菌的分类地位;通过不同时间接种共生菌到黑木耳菌棒的方法,研究两者的共生效应;通过子实体营养成分分析,研究共生菌对黑木耳子实体营养结构的影响。【结果】经分离纯化获得菌株 B-1,形态学和分子系统学分析将该菌株鉴定为毛色二孢属的可可毛色二孢(*Lasiodiplodia theobromae*)。通过不同时间接种黑木耳菌棒发现,此真菌与黑木耳间存在偏性共生关系。它对于黑木耳是偏利共生,还是偏害共生取决于黑木耳菌丝在菌棒中是否具有先占优势。黑木耳子实体营养成分分析显示,可可毛色二孢的存在改变了黑木耳子实体中营养结构,但黑木耳子实体形态特征无明显变化。【结论】可可毛色二孢与袋栽黑木耳存在着偏性共生关系,该现象为首次报道。

关键词: 可可毛色二孢, 形态学, 系统发育树, 黑木耳, 共生关系

Identification of a symbiotic fungus of bag-cultured *Auricularia auricula* and preliminary studies on its symbiotic effect

SONG Ting-Ting CAI Wei-Ming* JIN Qun-Li FAN Li-Jun FENG Wei-Lin
SHEN Ying-Yue

(Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China)

Abstract: [Objective] Identification of a symbiotic fungus of bag-cultured *Auricularia auricula* and preliminary studies on its symbiotic effect. [Methods] After purified the symbiotic fungus strain, it was identified by morphology and molecular biological analysis. The symbiotic fungus was inoculated at different stages of bag-cultured *A. auricula* to explain the relationship between the two fungi. The nutritional analysis of fruit bodies of *A. auricula* to explore the influence of the symbiotic fungus on nutritional structure of fruit bodies of *A. auricula*. [Results] The symbiotic fungus strain B-1 was identified as *Lasiodiplodia theobromae*. The inoculation experiment confirmed that the partial symbiosis between the *A. auricula* and strain B-1. The nutrition components of fruit bodies of *A. auricula* analysis found that it changed significantly in the case of the presence of strain B-1, and no obvious changed in morphology. [Conclusion] *A. auricula* and *L. theobromae* strain B-1 have the relationship of partial symbiosis, which is first report.

Keywords: *Lasiodiplodia theobromae*, Morphology, Phylogenetic tree, *Auricularia auricula*, Symbiosis

基金项目: 食用菌创新团队项目(No. 2009R50029); 2012 年度省博士后科研项目择优资助项目(No. Bsh1202086)

*通讯作者: ✉: Caiwm527@126.com

收稿日期: 2013-04-12; 接受日期: 2013-06-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

黑木耳[*Auricularia auricular* (L.) Underw]是木耳科木耳属的一种中温型好气木腐菌,其食用和药用价值高,营养丰富,除含有人体必需的8种氨基酸外,还含有多种矿质元素和多种维生素。国内外市场对黑木耳需求的增长和黑木耳价格不断攀升刺激了该产业的持续壮大。始于20世纪70年代的黑木耳生产,采用段木栽培,随着市场需求量的不断增大,而各地政府又不断推进实施天然林保护工程,致使耳、木矛盾日益突出。90年代后期至21世纪初,袋栽黑木耳技术的突破,极大推动了黑木耳生产的发展。但由于黑木耳菌丝对木质素、纤维素和半纤维素等复杂碳源的利用率低^[1],生长缓慢、抗逆境能力比较差,生产中频频发生木霉(*Trichoderma*)等有害竞争性杂菌感染引起的高烂棒率和绝收现象^[2],成为影响袋栽黑木耳生产发展的主要问题。

我们通过多年的样品采集和实践调查,在浙江省杭州淳安县多个黑木耳生产基地发现黑木耳菌棒被一种真菌感染后,菌棒褐化、坚实,且当有木霉等杂菌感染菌棒导致松软烂棒时,这些菌棒均未受其侵染并保持良好的坚实状态,能正常出耳,表现出与黑木耳似乎存在良好的“共生”关系,推测该菌在有限的菌棒空间里可能与黑木耳存在着一定的互作关系。

本研究对浙江省杭州市淳安县威坪镇黑木耳生产基地发现的褐化菌棒中的真菌进行了分离鉴定,并初步研究了该真菌与黑木耳的相互作用关系。

1 材料与方法

1.1 试剂和菌株

1.1.1 试剂:葡萄糖、琼脂粉、纤维素粉和各类化学试剂购自中国药品生物制品检定所;蛋白胨和酵母膏均来源于Sigma试剂公司;pUCm-T、*Taq* DNA聚合酶及其它分子生物学试剂均购自上海生工生物工程有限公司;引物合成和测序由上海生工完成。

纤维素培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 2.0, MgSO₄ 0.5, KH₂PO₄ 1.0, NaCl 0.5, 纤维素粉 2.0, 刚果红 0.4, 琼脂 22.0。

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20。

LB 培养基(g/L): NaCl 1.0, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, 琼脂 20.0。

黑木耳栽培的培养料: 杂木屑 90%, 麸皮 8%, 石膏 1%和红糖 1%; 含水量 53%。

1.1.2 菌株:本实验在浙江省杭州市淳安县威坪镇黑木耳生产基地采集到褐化、表面具有颗粒状突起的黑木耳菌棒用于共生真菌的分离。利用纤维素培养基作为筛选培养基,取含有共生真菌和黑木耳菌丝的菌棒组织块加入 0.02%的吐温水中漩涡振荡混匀后,稀释 100 倍涂布于纤维素筛选板上,在 25℃、12L:12D 的条件下培养 5–7 d 后,挑取萌发的新鲜菌丝转入 PDA 培养基中继续培养。待长出新鲜菌丝时将其转接到新的 PDA 平板中,连续 5 次继代后,获得纯菌株 B-1,放入 4℃ 保存备用。黑木耳菌株 916 (本实验室保藏菌株)用于共生鉴定和回接效应试验。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)用于质粒扩增和分子鉴定。

1.2 共生菌鉴定

1.2.1 共生菌回接验证实验:黑木耳栽培的培养料按常规方法填充入直径 15 cm 的栽培袋中制成料棒,料棒高 41–42 cm,按常规高压灭菌冷却后,将分离获得的共生菌纯菌种和黑木耳菌种同时接入料棒,在 22℃ 培养室内培养 50 d,以接入纯黑木耳和共生菌菌种的菌棒为对照,然后按常规方法发菌培养和刺孔催耳后,移至耳场排列出菇,观察菌棒褐化、表面颗粒状突起及出耳等情况,利用 1.1.2 中的方法重新分离该菌株,并通过 ITS 序列分析确证是否为回接菌株。

1.2.2 共生菌培养特征和形态学观测:将菌株接种到 PDA 培养基斜面上,在 25℃ 黑暗条件下培养,

观察比较菌落颜色变化, 显微镜测菌丝和分生孢子形态大小。对黑木耳菌棒中产生的共生菌真子座型载孢体进行石蜡切片观察, 步骤如下: 挑取真子座型载孢体, 经生理盐水清洗后, 在 4% 的甲醛固定液中固定 30–50 min。用 50%–70% 乙醇冲洗数次, 随后依次在 30%、50%、70%、80%、90% 各级乙醇溶液分别脱水 40 min, 然后放入 95%、100% 乙醇溶液各 2 次, 每次 20 min, 再分别用乙醇:二甲苯(1:1, 体积比)混合液和二甲苯浸泡 15 min 和 30 min 至透明。材料经上述固定、洗涤与脱水后, 用二甲苯浸泡去乙醇, 当组织全部被二甲苯占有而呈现出不同程度的透明状态时, 放入二甲苯:石蜡(1:1, 体积比)混合液 15 min, 再放入石蜡和透蜡各 30–60 min。最后放入透蜡中于 55–60 °C 恒温箱内浸泡 1–2 d, 将切片连同熔化的石蜡一起倒入容器内, 随之立即投入冷水中, 使其立刻凝固成蜡块, 然后进行切片、贴片、固化和染色, 用于显微观察。形态和理化鉴定参阅《真菌鉴定手册》^[3]。

1.2.3 共生菌 DNA 的提取、序列扩增测定及比对: DNA 提取参照 CTAB 方法^[4], 真菌核糖体基因转录间隔区 ITS1 和 ITS2、核糖体小亚基 SSU、大亚基 LSU、 β -Tubulin 以及延长因子 EF-1 α 的片段分别利用通用引物 ITS1/4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'/5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3')、NS1/4 (5'-GTAGTCATATGCTTGCTC-3'/5'-CTTCGTCAATTCCTTTAAG-3')、LR1/2 (5'-ACCCGCTGAACCTTAAGC-3'/5'-TACTACCACCAAGATCT-3')、Bt1/2 (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'/5'-ACCCTCAGTGAGTGACCCTTGCC-3') 和 EF1/2 (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'/5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3') 扩增。反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s (SSR 和 LSU) 或 30 s (其他), 共 35 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物经纯化后, 连接入 pUCm-T 载体中送交上海生工生物工程公司进行 DNA 双向测序, 测序引物为通用引物。序列用 Chromas.exe 软件进行修订后递交到 GenBank, 并用 BLASTn

进行同源性比较。

1.2.4 系统发育树的构建: 为了进一步确定分离获得的共生菌的种属地位, 扩增的真菌核糖体基因转录片段间隔区与 SSU 和 LSU 拼接获得的 18S rDNA-ITS1-5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA-LSU 序列、 β -Tubulin 以及延长因子 EF-1 α 的片段用于构建系统发育树。从 GenBank 中搜集基因比对高度相似的葡萄腔菌目 6 个属的 13 个不同种真菌 (*Lasiodiplodia crassisporea*、*L. gonubiensis*、*L. parva*、*L. pseudotheobromae*、*L. theobromae*、*Botryosphaeria dothidea*、*B. corticis*、*B. iberica*、*Phaeobotryon mamane*、*Neodeightonia phoenicum*、*N. subglobosa*、*Barriopsis fusca*、*Diplodia corticola*) 的序列, 首先用 ClustalX 1.81 将所有序列对齐, 删除缺失位点、残缺位点后, 利用 MEGA 4.0 软件进行系统发育分析, 以自展法(Bootstrap)进行检测, 共循环 1 000 次, 构建最大简约树(Maximum parsimony tree, MP)和邻接树(Neighbor-Joining tree, NJ)。系统发育树描述中的简约树长度、一致性指数(Consistency index, CI)、保留指数(Retention index, RI)等由 MEGA 4.0 提供报告。用 Tajima-Nei 法检测序列中性突变的稳定性。

1.3 共生效应分析试验

采用 1.2.1 中回接实验的方法, 对共生菌和黑木耳(菌株 916)之间的共生效应进行分析, 分别按以下不同处理方法接种黑木耳和共生菌菌种: (1) 料棒同时接种黑木耳与共生菌菌种, 置温度为 22–25 °C、相对湿度为 50%–70% 的培养室培养 50 d; (2) 料棒先接种黑木耳菌种, 在温度为 22–25 °C、相对湿度为 50%–70% 的培养室培养 20 d 后接种共生菌, 继续培养 30 d; (3) 料棒接种黑木耳菌种培养 40 d 至菌丝长满菌棒时, 接种共生菌, 继续培养 10 d; (4) 对照纯黑木耳菌棒, 料棒接种黑木耳菌种后在相同条件下培养 50 d。4 种处理均按常规方法同时进行刺孔养菌催耳后, 移至耳场排场出耳, 观察记录出耳情况、子实体形态和产量。

1.4 纯黑木耳菌棒和可可毛色二孢共生菌黑木耳菌棒的子实体营养成分比较分析

分别将正常黑木耳和可可毛色二孢共生菌棒上收获的黑木耳子实体送农业部农产品及转基因产品质量安全监督检验测试中心(杭州)测定粗蛋白(GB 5009.5-2010)、总糖总纤维(GB/T 5009.8-2008)、粗脂肪(GB/T 5009.20-2003)以及钾、钙和磷离子(GB/T 5009.91/92/87-2003)的含量。

2 结果与分析

2.1 共生菌回接验证结果

从基地中获得的感染共生菌而褐化、坚实的黑木耳菌棒,表面有零星的坚硬凸起,无其它杂菌污染。分离纯化获得的共生菌菌株回接于黑木耳菌棒,培养 20-40 d 后陆续出现了与原始感染共生菌的菌棒相一致的性状。并从菌棒中再分离获得的共生菌与回接的共生菌相同,分离获得的真菌为黑木耳菌棒中的共生菌。

2.2 共生菌的鉴定

2.2.1 培养特征及形态学观测: 在实验室培养的条件下,初期菌落均为白色,边缘菌丝粗壮,放射状生长,中后期菌落从接种点开始变橄榄色,后期变褐色,不产生子实体结构。气生菌丝发达,菌丝白色,多呈棉絮状,布满整个试管内(图 1A)。在黑木耳菌棒中,接种共生菌培养 20-30 d 后菌棒褐化,显微观察菌棒中有大量的褐化菌丝和成熟的分生孢子,并观察到厚膜孢子样链状菌丝细胞(图 1C)。真子座型载孢体黑色,经石蜡切片显微观测,分生孢子器散生于载孢体中,球形或近球形,单室,大小(110-205) μm×(110-250) μm (图 1E、F)。分生孢子多椭圆形,表面光滑,两端钝圆,表面有规则的梭状条纹,初期分生孢子无色、无隔膜,随着孢子成熟渐变褐色或者黑褐色,在中部产生一横隔膜,成熟孢子大小为(14.0-18.5) μm×(8.6-10.8) μm,平均 L/B 为 1.7 (图 1D)。由于该共生菌的有性型形态未被观察到,根据其菌丝培养特征、分生孢子器及分生孢子的形态,初步鉴定为葡萄腔座菌科的一种真菌。

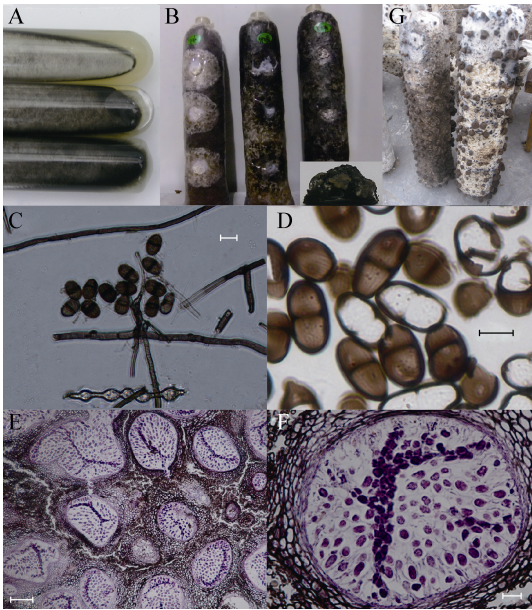


图 1 可可毛色二孢的生长特性

Figure 1 The characteristics of *L. theobromae*

注: A: 在 PDA 斜面 25 °C 培养 5、10 和 15 d (由上到下) 的菌落形态; B: 纯黑木耳菌棒, 可可毛色二孢与黑木耳共生菌棒和可可毛色二孢菌棒(从左到右)在 22-24 °C 下培养 30 d 的状态及在菌棒上分离到的真子座型载孢体(右下); C: 分生孢子和色素沉着的厚膜孢子样链状菌丝细胞; D: 分生孢子的形态; E: 真子座型载孢体的剖面; F: 分生孢子器剖面放大; G: 黑木耳菌棒培养 40 d 后接种可可毛色二孢和正常木耳菌棒出耳情况的比较。标尺: C、D=10 μm; E=100 μm; F=20 μm。

Note: A: Colonies of *L. theobromae* after incubated on PDA for 5 d, 10 d and 15 d at 25 °C (from top to bottom); B: Cultivation bags of *A. auricular*, *A. auricula* and *L. theobromae* cocultured and *L. theobromae* respectively (from left to right) cultured at 22-24 °C after 30 d and the conidiomita formed in cultivation bag (inset); C: Mature conidia and pigmented chlamydospore-like hyphal cells in chains; D: The morphology of conidia; E: Cross-section of conidiomita; F: Morphology of the pycnidia under magnification; G: The comparison of *A. auricular* fruiting in normal and *L. theobromae* inoculated cultivation bag. Scale bars: C, D=10 μm; E=100 μm; F=20 μm.

2.2.2 rDNA-ITS、β-Tubulin 和 EF-1α 区段的 PCR 扩增及测序结果: 分离获得的黑木耳共生菌菌株 B-1 的 28S rDNA 长度为 1 421 bp, 平均 GC 含量 51.7%; 间隔 ITS 区段直接测序长度为 547 bp, 平均 GC 含量 51.9%; 18S rDNA 长度为 1 134 bp, 平均 GC 含量 45.4%; β-Tubulin 和 EF-1α 序列扩增长度分别为 401 和 291 bp。测序结果经校对后提交到

GenBank 数据库, 登录序列号分别为 KC442314、KC442315、KC442316、KC442317 和 KC442318。根据 5 个基因序列的比对结果, 结合形态学特征, 黑木耳菌棒中分离到的共生菌初步鉴定为葡萄座腔菌科的可可毛色二孢 *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.。该菌的异名有 *Botryosphaeria theobromae* Pat. 和 *Diplodia gossypina* Cooke 等。该菌的有性型属于子囊菌葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae, 在本次试验中未观察到。

2.2.3 多基因序列聚类分析: 由于该菌的有性态尚未观察到, 无性孢子与多种葡萄腔座菌科真菌相似, 同时单基因的序列与葡萄腔座菌科的成员相似性较高, 需要通过多基因聚类分析的方法进一步确定分离菌株的分类地位(图 2)。为此我们拼接了间隔区、18S 和 28S rDNA, 获得的 18S rDNA-ITS1-5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA 序列与 β -Tubulin 以及延长因子 EF1- α 的片段相结合, 删除缺失位点, 截取约 3 000 bp 序列位点用于与已知的单基因比对相似性较高的 6 个属的 13 个菌株共同进行系统发育分析。

序列经 MEGA 4.0 软件构建的 MP 简约树长度(Length)=568, 一致性指数(Consistency index, CI)=0.753 521, 总留存指数(Retention index, RI)=0.734 345, 总尺度化一致性指数

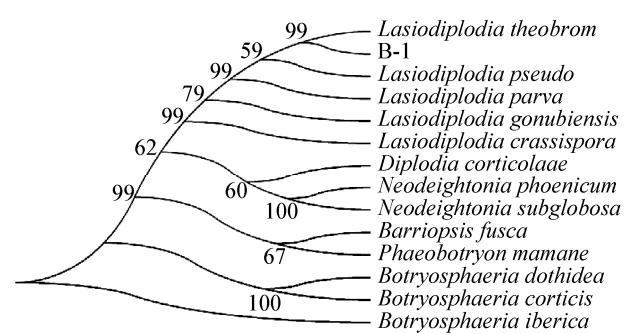


图 2 基于 18S rDNA-ITS1-5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA、 β -Tubulin 和 EF1- α 序列的 14 个葡萄腔座菌科菌株的最大简约系统树

Figure 2 Maximum parsimony phylogeny tree of 14 strains of Botryosphaeriaceae based on the sequence of 18S rDNA-ITS1-5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA, β -tubulin and EF1- α

RCI=0.553 345。Tajima-Nei 统计值-0.893 25, $P>0.1$, 说明该科属的各个菌株的序列保守度较高, 进化稳定, 无明显正突变, 自然选择在序列进化中起主要作用。通过系统树分析结果显示, B-1 菌株与 *L. theobromae* 聚成一个分支, 其步长值(Bootstrap value)为 99%。因此, 可将该菌株鉴定为可可毛色二孢 *L. theobromae*。

2.3 共生效应分析

不同黑木耳菌棒发菌阶段接种可可毛色二孢对黑木耳芽形成与产量的影响试验结果表明(表 1), 同一个处理组的重复间差异不显著($F_{3,15}=1.3$, $P=0.33$)。正常菌棒的三潮黑木耳的平均产量为 61 g/菌棒; 同时接入黑木耳和可可毛色二孢, 以及先接种黑木耳培养 20 d 后接入可可毛色二孢的菌棒, 平均产量分别为 12.60 g/菌棒和 27.20 g/菌棒, 均显著低于未接种可可毛色二孢的正常对照菌棒($P<0.001$); 而先接种黑木耳培养 40 d 后接入可可毛色二孢的菌棒, 平均产量为 52.00 g/菌棒, 与未接种可可毛色二孢的正常对照菌棒相比, 产量下降不明显($P=0.46$)。

表 1 不同黑木耳菌棒发菌阶段接种可可毛色二孢对黑木产量的影响		
Table 1 The influence of different infection time of <i>L. theobromae</i> on yeild of <i>A. auricula</i>		
处理 Treatments	总产量均值±标准差(克/菌棒) [†] $\bar{x}\pm s$ (g/bag) [†]	$F_{1,7}$ 值 ^{††} $F_{1,7}$ value ^{††}
1	12.60±3.70 c	720.0**
2	27.20±5.70 b	32.0*
3	52.00±8.90 a	1.1
4	61.05±6.70 a	—

注: 1: 同时接种黑木耳和共生菌; 2: 接种黑木耳培养 20 d 后接共生菌; 3: 接种黑木耳培养 40 d 后接共生以; 4: 对照组的正常黑木耳菌棒。†: 同一列标注不同字母的均值差异显著(Tukey's HSD, $P<0.05$); ††: F 检测的 $P<0.05$ (*)或 <0.01 (**).

Note: 1: *A. auricula* and *L. theobromae* were inoculated at the same time; 2: *L. theobromae* was inoculated after 20 d of *A. auricular* inoculation; 3: *L. theobromae* was inoculated after 40 d of *A. auricular* inoculation; 4: The control of normal *A. auricular* bag. †: Means with different letters in each row differed significantly (Tukey's HSD, $P<0.05$); ††: F test in one-way ANOVA: $P<0.05$ (*) or 0.01 (**).

2.4 黑木耳子实体营养成分比较分析

共生可可毛色二孢菌棒所产的黑木耳子实体形态与对照无明显差别。从纯黑木耳菌棒和可可毛色二孢共生黑木耳菌棒上收获的黑木耳子实体的营养成分分析结果显示,两种黑木耳的营养成分含量发生了重要的变化(表 2)。与正常菌棒所产的黑木耳子实体相比,可可毛色二孢共生黑木耳菌棒所产的黑木耳子实体的蛋白含量显著下降,总糖含量显著上升,钾离子含量明显下降。

3 讨论

子囊菌亚门座囊菌纲葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria* Ces. & De Not.)是 1963 年提出的概念^[5],泛指子座或假囊壳型囊子实体中产生双囊壁子囊的一类真菌的总称。但是长期以来,*Botryosphaeria* 种间因为形态相似、繁殖体结构不易产生、无性态区别模糊、寄主谱广并存在交叉感染等特征^[6-7],基于传统的真菌形态分类学研究方法(例如形态学、培养学与病理特征,寄主类型等)已经不能很好地将该属的真菌进行分类,使得该属多数真菌的分类地位自发现以来就存在很多争议,真菌名称及分类地位多次变更。随着该类真菌大量

新种的报道和有性形态的发现,Theissen 和 Sydow (1915)首次提出将葡萄座腔菌属归类于葡萄座腔菌科(*Botryosphaeriaceae*)这一范畴^[8]。近年来,由于分子系统学研究取得的成果,一些在形态和生物学上模糊的种在分子系统学上得到澄清,科研人员发现一种有性形态往往对应着多种无性形态的种。Crous 等(2006)提出了另一个观点,他们认为很难用一个单一的概念来囊括目前已认识到的所有葡萄座腔座目真菌^[9]。为了解决这一问题他利用 28S rDNA 的系统树分析,将已报道的该属的有性形态和无性形态的真菌分列为多个不同的属,最终发现这样的分类方法与所观察到的形态学特征相吻合,为日后的鉴定工作提供了可靠的理论基础。在本实验中,经形态学观测,结合分子生物学和系统树学的计算分析,在黑木耳菌棒上分离到的 B-1 菌株最终被鉴定为可可毛色二孢。菌株 B-1 的分生孢子大小为(14.0–18.5) $\mu\text{m}\times(8.6\text{--}10.8)\mu\text{m}$,略小于已报道的江浙一带广泛存在的引起植物病害的病原菌的分生孢子(19.4–25.8) $\mu\text{m}\times(10.3\text{--}12.9)\mu\text{m}$ ^[10]。推测该菌株在不同的生存条件下产生不同形态大小的孢子和分生孢子器。

表 2 正常黑木耳菌棒与可可毛色二孢共生的黑木耳菌棒产生的子实体营养成分比较			
Table 2 The nutrient composition of <i>A. auricula</i> fruiting bodies from normal cultivation bag vs. <i>L. theobromae</i> infected <i>A. auricula</i> cultivation bag			
检测项目 Tested items	子实体中不同组分的含量均值±标准差 [†]		<i>F</i> _{1,5} 值 ^{††} <i>F</i> _{1,5} value ^{††}
	<i>x</i> of different components± <i>s</i> [†]		
	正常菌棒的黑木耳子实体 Fruiting bodies from nomral cultivation bag	共生菌棒的黑木耳子实体 Fruiting bodies from symbiosis cultivation bag	
粗蛋白 Crud protein (%)	1.970 0±0.010 0 a	1.580 0±0.005 8 b	3 364.00**
总糖 Total carbohydrate (%)	8.400 0±0.100 0 a	10.300 0±0.100 0 b	541.00**
粗纤维 Crude fiber (%)	0.710 0±0.079 0 a	0.800 0±0.040 0 a	3.29
粗脂肪 Crude fat (%)	0.390 0±0.031 0 a	0.420 0±0.012 0 a	1.53
磷 P (g/100 g)	0.068 0±0.001 0 a	0.045 0±0.001 0 a	793.00
钾 K (mg/100 g)	150.730 0±2.930 0 a	142.200 0±2.650 0 b	14.00*
钙 Ca (mg/100 g)	63.430 0±2.490 0 a	68.630 0±4.460 0 a	3.11

注: [†]: 同一行标注不同字母的均值差异显著(Tukey's HSD, $P<0.05$); ^{††}: F 检测的 $P<0.05$ (*)或 <0.01 (**).
Note: [†]: Different letters in each line differed significantly (Tukey's HSD, $P<0.05$); ^{††}: F test in one-way ANOVA: $P<0.05$ (*) or 0.01 (**).

共生效应实验显示,过早接种或自然感染可可毛色二孢,共生菌生长量大,竞争培养料的养分和生长空间,导致黑木耳菌丝生长受限,生物量少,影响产量,形成偏害共生关系;经发菌培养后接种或菌棒培养后期自然感染可可毛色二孢,黑木耳菌丝已充分生长并积累了供子实体生长所需的养分,而可可毛色二孢则能分解利用黑木耳菌丝不能分解利用的营养,在一定程度上防止菌棒感染杂菌而引起的烂棒,同时可可毛色二孢对黑木耳没有毒害或致病性,能与黑木耳形成偏利共生关系。生产调查也表明,可可毛色二孢感染越早,对耳芽的形成量影响越大,反之则影响越小,这说明了两种真菌能共生于有限的培养基中而形成偏性共生的关系。

葡萄腔菌科真菌有强的木质素分解能力,是一类全球分布的腐生、寄生或内生的真菌。与其它真菌所引起的树木溃疡病相比,此类病原真菌对树木的影响不仅是因为它们寄主范围广泛,传播迅速,更重要的是它们还可以分泌多种毒素造成寄主的溃疡甚至坏死^[11]。据研究报告,一些葡萄座腔菌科真菌分泌的次级代谢物不仅对癌细胞的生长有抑制作用,同时其中某些组分对一些病原菌也有抑制作用^[12-14]。我们推测黑木耳菌棒接种或自然感染可可毛色二孢后,一方面,可可毛色二孢吸收利用了菌棒中未被黑木耳吸收利用的营养,消除有害杂菌生长所需的营养而避免感染绿色木霉等有害杂菌;另一方面,可可毛色二孢的生长及其代谢产物可能具有抑制有害杂菌的作用,从而增强了黑木耳菌棒的抗病力。这一研究结果对未来如何通过生防技术防止绿色木霉等侵染黑木耳菌棒而引起的烂棒具有重要的现实意义,有关可可毛色二孢与黑木耳间的共生互作机制,有待于做深入探讨研究。

参考文献

- [1] Liers C, Arnstadt T, Ullrich R, et al. Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by directwood and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood[J]. Microbiology Ecology, 2012, 78(1): 91-102.
- [2] 李宏伟. 黑木耳袋料栽培中常见病虫害的防治[J]. 牡丹江师范学院学报: 自然科学版, 2007, 59(3): 38-39.
- [3] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 科学技术出版社, 1990: 408-458.
- [4] 张颖慧, 魏东盛, 邢来君, 等. 一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 445-450.
- [5] Cesati V, Notaris G de. Schema di classificazione degli Sferiacei italici aschigeri[J]. Commentario della Società Crittogamologica, Italiana, 1863, 1(4): 177-240.
- [6] Smith CO. Inoculations showing the wide host range of *Botryosphaeria ribis*[J]. Journal of Agriculture Research, 1934, 49: 467-476.
- [7] 景耀, 刘会香. 杨树和核桃溃疡病菌的交叉接种试验[J]. 森林病虫通讯, 1987, 2(1): 4-9.
- [8] Theissen F, Sydow H. Die Dothideales[J]. Annales Mycologici, 1915, 13: 149-746.
- [9] Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, et al. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*[J]. Studies in Mycology, 2006, 55(1): 235-253.
- [10] 李红叶, 曹若彬, 方华生, 等. 梅树流胶病原真菌的研究[J]. 云南农业大学学报, 1990, 45(1): 11-16.
- [11] 吴小芹, 何月秋, 刘忠华. 葡萄座腔菌属所致树木溃疡病发生与研究[J]. 南京林业大学学报, 2001, 25(1): 61-66.
- [12] Abdou R, Scherlach K, Dahse H, et al. Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*[J]. Phytochemistry, 2010, 71(1): 110-116.
- [13] Xu YH, Lu CH, Zheng ZH. A new 3,4-dihydroisocoumarin isolated from *Botryosphaeria* sp. F00741[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2012, 48(2): 205-207.
- [14] Liu JK, Phookamsak R, Doilom M, et al. Towards a natural classification of *Botryosphaeriales*[J]. Fungal Diversity, 2012, 57(1): 149-210.