

覆土层中细菌对暗褐网柄牛肝菌子实体生长的影响

刘静 王文兵 纪开萍* 张春霞 何明霞

(云南省热带作物科学研究所 云南 景洪 666100)

摘要: 【目的】筛选对暗褐网柄牛肝菌菌丝及子实体生长有促进作用的细菌单菌株, 并对其鉴定。【方法】将 3 株细菌菌株 C1、T24、T34 及引进 4 株细菌菌株 1B00263、1A0081、1A03263、1A01082 单菌株添加到覆土层, 定期测覆土层菌丝生长长度、原基形成时间、原基数目、子实体成熟数及子实体重。选出对暗褐网柄牛肝菌菌丝及子实体生长有促进作用的菌株, 并采用分子生物学方法对其进行鉴定。【结果】添加 T34 菌株的处理在暗褐网柄牛肝菌子实体整个形成过程中起着重要的作用, 不仅对覆土层暗褐网柄牛肝菌菌丝生长有显著促进作用, 对子实体形成、平均单菇重也有显著促进作用; 添加 C1、T24、1A01082、1B00263、1A03263 单菌株的处理对覆土层暗褐网柄牛肝菌菌丝的生长有显著的促进作用; 添加 1A0081、1B00263、C1、1A03263 单菌株的处理, 原基形成时间(19.86–24.14 d)比对照(27.00 d)提前 7–3 d, 对暗褐网柄牛肝菌原基的形成也有促进作用。C1、T24、T34 对暗褐网柄牛肝菌菌丝、子实体的生长起着不同程度的促进作用, 这 3 株细菌经分子生物学鉴定, 结果为: C1 为短杆菌属(*Brevibacterium* sp.), T34 为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.), T24 的种属关系还有待进一步确定。【结论】7 株细菌单菌株添加到覆土层, 研究其对暗褐网柄牛肝菌菌丝及子实体生长的影响。最终筛选到一株细菌菌株 T34 (芽孢杆菌属 *Bacillus* sp.), 对暗褐网柄牛肝菌菌丝及子实体的生长均有显著的促进作用。

关键词: 暗褐网柄牛肝菌, 覆土, 细菌菌株

基金项目: 云南省应用基础研究项目(No. 2008CD193); 国家自然科学基金项目(No. 31060271); 农业科技成果转化资金项目(No. 2011GB2F300004)

*通讯作者: Tel: 86-691-2120331; 信箱: jkpcnlc@126.com

收稿日期: 2012-02-17; 接受日期: 2012-03-30

Effect of bacteria in the casing soil for fruit of *Phlebopus portentosus*

LIU Jing WANG Wen-Bing JI Kai-Ping* ZHANG Chun-Xia HE Ming-Xia

(Yunnan Tropical Crops Research Institute, Jinghong, Yunnan 666100, China)

Abstract: [Objective] Screened bacterial strains which had a significant effect on mycelia and fruit body growth, and further made species identification. [Methods] Added the single strain of three bacterial strains C1, T24, T34 and four introduced bacterial strains 1B00263, 1A0081, 1A03263, 1A01082 to the casing layer, and then regular survey was mad, including the length of mycelia growth, time for primodia to emerge, number of primodia, and number and weight of mature fruit bodies. After the bacterial strains that had a significant effect on mycelia and fruit body growth were screened, molecular biology identification was further made. [Results] Adding T34 strain had a great effect on the fruit body. T34 strain not only could promote the growth of fruit bodies, but also played an important role in promoting fruit body formation and increasing the weight of individuals, indicating T34 was an ideal bacterial strain. Adding C1, T24, 1A01082, 1B00263 and 1A03263 had significant effects on fruit body growth. Meantime, adding 1A00081, 1B00263, C1 and 1A03263 could shorten the time for primodia to emerge (treatment 19.86–24.14 d and control 27.00 d). C1, T24 and T34, which had different effect degrees of on the growth of mycelia and fruit body, were further made molecular biology identification. The identification results were as follows: C1 belongs to *Brevibacterium*, T34 belongs to *Bacillus*, and T24 needs to be further determined. [Conclusion] By adding seven bacterial strains to the casing soil, we studied their effects on the growth of mycelia and fruiting body of casing soil *Phlebopus portentosus*. In result T34 (*Bacillus* sp.) was screened as the one bacterial strain that had a significant promotional effect on both mycelia and fruit body growth.

Keywords: *Phlebopus portentosus*, Casing soil, Bacterial strains

暗褐网柄牛肝菌 [*Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn], 又名巨型牛肝菌, 属于牛肝菌目小牛肝菌科脉柄牛肝菌属^[1]。分布于斯里兰卡、越南、印度尼西亚、泰国、巴西、墨西哥、澳大利亚, 新西兰等地区, 国内广西、海南、云南都有分布^[2-7]。其子实体味道鲜美, 富含蛋白质和钾、钙、镁、铁、锌等多种人体所需的矿物质元素^[8-10], 具有很高的经济价值。目前市场

上供应的暗褐网柄牛肝菌以野生为主, 因此实现其人工栽培具有重要意义。覆土是双孢蘑菇、平菇、鸡腿菇等许多食用真菌人工栽培过程中的必要环节, 在暗褐网柄牛肝菌栽培过程中, 覆土也是其子实体形成的必要条件。曹旻等^[11]的研究表明, 暗褐网柄牛肝菌瓶栽条件下出菇必须经过覆土, 覆土中的微生物能抵抗外界微生物的污染, 并对暗褐网柄牛肝菌子实体的形成有促进作用。

刘静等^[12]的研究表明,经液体发酵和平板试验筛选出的3株细菌C1、T24、T34,对暗褐网柄牛肝菌的菌丝生长有促进作用。本文进一步研究这3株细菌及引进菌株^[13]对暗褐网柄牛肝菌原基形成时间、原基数目、子实体成熟数目及平均单菇重的影响,并对3株细菌进行了分子鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌种:暗褐网柄牛肝菌菌种(菌株编号: B-01-3-1)由云南省热带作物科学研究所植物保护与微生物利用研究室提供。

1.1.2 供试菌株:细菌菌株(菌株编号: C1、T24、T34,暗褐网柄牛肝菌人工栽培所使用覆土材料中分离得到)由云南省热带作物科学研究所植物保护与微生物利用研究室提供。

引入已报道对双孢菇(*Agaricus bisporus*)生长有促进作用的菌株:巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* (编号: 1B00263)、粪产碱杆菌 *Alcaligenes faecalis* (编号: 1A00081)、环状假单胞杆菌 *Bacillus circulans* (编号: 1A03263)和恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* (编号: 1A01082),4株菌均由中国海洋微生物菌种保藏管理中心提供。

1.1.3 培养基:细菌培养基(g/L):牛肉膏 3,蛋白胨 10,氯化钠 5,琼脂 18,pH 7.4-7.6。液体培养基(g/L):去皮马铃薯 200,葡萄糖 20,酵母膏 1, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,pH 自然。

1.1.4 覆土层土壤:果园土采自云南省景洪市柚子树下表土(10 cm-20 cm),草炭由呈贡园林栽培基质公司提供。果园土和草炭等体积混合后制成覆土层土壤,pH 为 4-5,含水量为 60%。

1.2 方 法

1.2.1 细菌对覆土层菌丝生长及子实体生长的影响:细菌菌株(菌株编号: C1、T24、T34)及引进菌株(菌株编号: 1A01082、1B00263、1A00081、

1A03263)进行活化培养,将各菌株活化菌液接种于装有 150 mL 液体培养液的 250 mL 三角瓶中(每瓶接种 2 环),28 °C 摇床培养 48 h,无菌条件下定量取菌液添加于灭菌的覆土材料中并与之混匀,以平板菌落计数法计数细菌浓度(CFU/mL),再换算成覆土层土壤中含菌浓度(10^4 - 10^6 CFU/g 土),以覆纯灭菌土(CK)为对照,每个处理 8 次重复(每个重复 8 瓶)。覆土后的菌瓶放于菇房中培养菌丝生长及出菇。当菌丝长满覆土层后,揭去瓶口覆盖的薄膜,喷无菌水保湿覆土层湿润培养出菇。定期测覆土层菌丝生长长度、原基形成时间、原基数目、子实体成熟数目及子实体重量,筛选促进暗褐网柄牛肝菌菌丝生长及子实体生长的细菌单菌株。

1.2.2 有益细菌种类鉴定:利用氯苯法^[14]提取 3 株有益细菌菌株总 DNA。16S rDNA 序列的扩增采用细菌通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3',由云南农业大学植物病理实验室细菌组完成。测序得到的 16S rDNA 序列在 GenBank 中分别进行同源序列搜索(BLAST search),并下载相关类群微生物模式菌株的 16S rDNA 序列,用 ClustalX 软件^[15]对各相关菌株编码序列进行比对之后用 MEGA 4.0 软件^[16],进行邻接法(Neighbor-Joining)分析,1 000 次重复^[17],构建系统发育树。

2 结 果

2.1 对覆土层暗褐网柄牛肝菌菌丝生长、原基形成时间的影响

由表 1 可以看出,覆土层中添加各细菌菌株覆土 10 d 后,细菌菌株 1A01082、C1、T24、1B00263、1A03263、T34 处理的覆土层暗褐网柄牛肝菌菌丝的生长长度(4.88 cm-3.00 cm)均显著高于对照(2.38 cm),说明这几株细菌在覆土培养

菌丝生长过程中有极显著促进暗褐网柄牛肝菌菌丝生长的作用, 是较好的菌株。

1A00081、1B00263、C1、T34、1A03263 原基形成时间(19.86–24.14 d)比对照(27.00 d)提前 7–3 d, 说明这几株细菌对暗褐网柄牛肝菌原基的形成有促进作用。

由表 2 可以看出, T24 菌株处理的原基(图 1)数目(0.14)与对照(1.86)相比有显著差异, 可

能是覆土层被青霉污染, 从而影响原基的形成; 其余菌株与对照相比均没有显著差异。说明添加细菌菌株对原基的形成没有明显的促进作用。

在子实体成熟数目上, T34 菌株的处理子实体(图 2)成熟数目(0.71)高于对照(0.14), 与对照相比达到显著差异水平, 说明 T34 菌株对子实体的形成有显著的促进作用。

表 1 细菌单菌株对覆土层暗褐网柄牛肝菌菌丝生长、原基形成时间的影响

Table 1 Effect of different bacterial strains on the mycelial growth and time for primordia to emerge *P. portentosus*

| 细菌菌株 Bacterial strain | 菌丝长度 Mycelia growth in casing for 10 d (cm) | 细菌菌株 Bacterial strain | 原基形成的时间 Time for primordia to emerge (d) |
|--------------------------|--|--------------------------|---|
| 1A01082 | 4.88Aa | T24 | 34.57Aa |
| C1 | 4.44ABab | 1A01082 | 27.00ABab |
| T24 | 3.88ABCbc | CK | 27.00ABab |
| 1B00263 | 3.69ABCbc | 1A03263 | 24.14ABb |
| 1A03263 | 3.44BCDc | T34 | 22.29Bb |
| T34 | 3.38BCDc | C1 | 22.00Bb |
| 1A00081 | 3.00CDcd | 1B00263 | 20.86Bb |
| CK | 2.38Dd | 1A00081 | 19.86Bb |

注: 表中数据为 8 个重复的平均值; 不同大小写字母代表在 0.01 和 0.05 水平差异显著。

Note: Values shown are the means \pm SD of eight determinations. Different higher and lower case represent significance at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

表 2 细菌单菌株对暗褐网柄牛肝菌出菇情况的影响

Table 2 Effect of different bacterial strains for vegetative and fruiting characteristics *P. portentosus*

| 细菌菌株 Bacterial strain | 原基数目 Number of primordia | 细菌菌株 Bacterial strain | 子实体成熟数目 Number of mature fruit bodies | 细菌菌株 Bacterial strain | 平均单菇重 Weight of individual fruit bodies (g) |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|--|--------------------------|--|
| CK | 1.86Aa | T34 | 0.71Aa | T34 | 37.43Aa |
| 1B00263 | 1.57ABa | 1A03263 | 0.57ABab | 1A03263 | 21.29ABab |
| C1 | 1.43ABa | 1A00081 | 0.57ABab | 1A00081 | 19.71ABab |
| 1A00081 | 1.29ABab | C1 | 0.43ABabc | 1A01082 | 18.14ABab |
| T34 | 1.14ABab | 1A01082 | 0.43ABabc | C1 | 18.14ABab |
| 1A01082 | 1.00ABab | 1B00263 | 0.14ABbc | 1B00263 | 5.71ABb |
| 1A03263 | 0.71ABab | CK | 0.14ABbc | CK | 4.29Bb |
| T24 | 0.14Bb | T24 | 0.00Bc | T24 | 0.00Bb |

注: 表中数据为 8 个重复的平均值; 不同大小写字母代表在 0.01 和 0.05 水平差异显著。

Note: Values shown are the means \pm SD of eight determinations. Different higher and lower case represent significance at 0.01 and 0.05 levels, respectively.



图 1 暗褐网柄牛肝菌原基形态

Fig. 1 The primordia morphology of the *Phlebotomus portentosus*



图 2 暗褐网柄牛肝菌子实体形态

Fig. 2 The fruit body morphology of the *Phlebotomus portentosus*

在平均单菇重上, T34 菌株的处理平均单个子实体的重(37.43 g)极显著高于对照(4.29 g), 与对照相比达到极显著差异水平, 说明 T34 菌株对子实体的平均单菇重有极显著的促进作用。

2.2 有益细菌菌株的系统发育分析

细菌 C1、T34、T24 与 GenBank 数据库中其他细菌的 16S rDNA 序列进行比较, 系统发育树见图 3, 发现与菌株 C1 基因序列最相似的 4 条序列皆为短杆菌属菌株的基因序列, 相似性为 99%, 进化树分析表明: C1 与表皮短杆菌 *Brevibacterium epidermidis* (GU576981)、黄金短杆菌 *Brevibacterium aureum* (AY299093)、碘短杆

菌 *Brevibacterium iodinum* (FJ652620)、速生短杆菌 *Brevibacterium celere* (NR025727) 等 4 株菌自然类聚在一大分支上, 属于同一类群, 初步确定 C1 为短杆菌属的一种; 与菌株 T34 基因序列最相似的 3 条序列皆为芽孢杆菌属菌株的基因序列, 相似性为 96%, 进化树分析表明: T34 与地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* (AY 947531)、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (HQ 202549)、淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (FJ 222551) 等 3 株菌自然类聚在一大分支上, 可能属于同一类群; 菌株 T24 基因序列与最相似的食物芽孢杆菌 *Bacillus benzoevorans* (AY 043085)、环状芽孢杆菌 *Bacillus circulans* (JN 644554) 等两株菌相似性仅为 93%, 进化树分析表明: T24 虽然与这两株菌自然类聚在一大分支上, 但其种属关系有待进一步确定。

3 结论与讨论

3.1 结论

本文的研究表明, 从覆土层分离筛选到的 3 株细菌菌株(C1、T24、T34)及引进 3 株细菌菌株(1A01082、1B00263、1A03263)对覆土层暗褐网柄牛肝菌菌丝的生长有显著的促进作用; 1A00081、1B00263、C1、T34、1A03263 细菌菌株对暗褐网柄牛肝菌原基的形成也有促进作用; 其中 T34 细菌菌株在暗褐网柄牛肝菌子实体的整个形成过程中起着重要的作用, 不仅对覆土层暗褐网柄牛肝菌菌丝生长有显著促进作用, 对子实体形成、平均单菇重也有显著促进作用, 是较好的细菌菌株。

从覆土层分离筛选到的 3 株细菌菌株(C1、T24、T34)对暗褐网柄牛肝菌菌丝、子实体的生长起着不同程度的促进作用, 因此将这 3 株细菌进行分子生物学鉴定, 鉴定结果为: C1 为短杆菌属、T34 为芽孢杆菌属、T24 的种属关系还有待进一步确定。

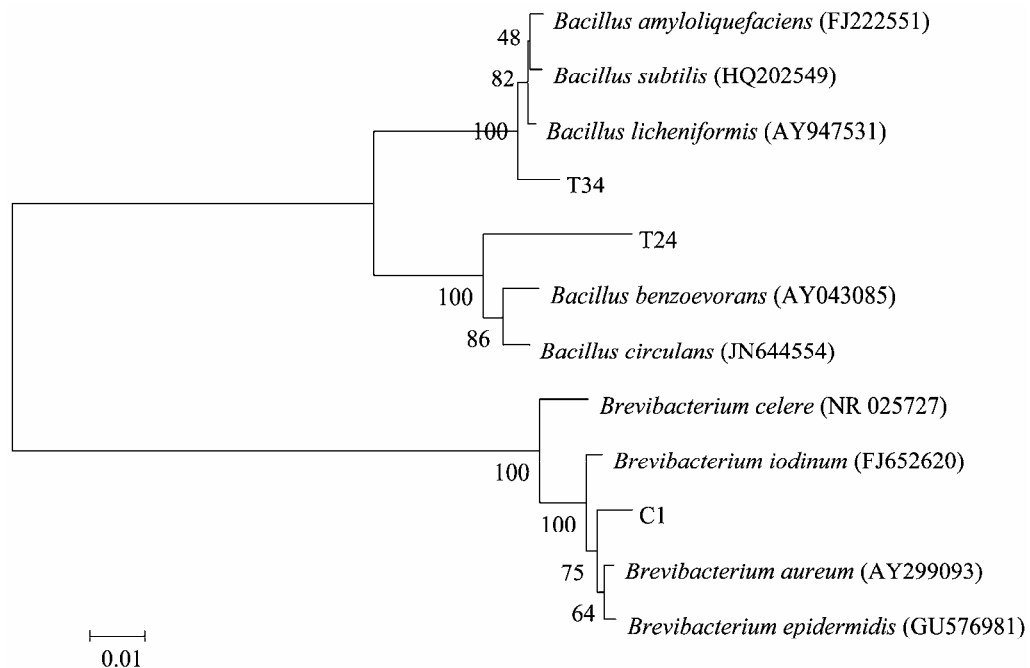


图3 细菌 C1、T34、T24 的 16S rDNA 序列与其他细菌亲源关系及进化树

Fig. 3 Genetic relationship and evolutionary trees of 16S rDNA sequence of bacteria C1, T34, T24 and other bacteria

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar: 0.01 represent sequence divergence. The number in brackets was the accession number of each strain.

3.2 讨论

覆土微生物中细菌对子实体形成的影响研究较多,最著名的是 Hayes 等^[18]从覆土层中分离出臭味假单孢杆菌(*Pseudomonas putida*)并在洋菜培养基上诱导出了双孢蘑菇子实体; Rainey^[19]研究认为,臭味假单孢杆菌(*Pseudomonas putida*)能促进双孢蘑菇菌丝体生长的速度。因此,研究覆土层中的细菌及其作用在蘑菇生产上有重要意义。T34 菌株为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),对暗褐网柄牛肝菌菌丝、子实体的整个形成过程都有促进作用,引进菌株巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* (编号: 1B00263)对覆土层暗褐网柄牛肝菌菌丝的生长、原基的形成也有促进作用,这一研究结果与 Ahlawat 等^[13]、杜爱玲等^[20]得出的结论基本一致。

参 考 文 献

- [1] Pegler DN. Agaric flora of Sri Lanka (Kew Bulletin Additional Series)[M]. London: HMSO, 1986, (12): 1-519.
- [2] Maria AN, Marina C. A preliminary checklist of Boletales from Brazil and notes on Boletales specimens at the Instituto de Botânica (SP) Herbarium, São Paulo, SP, Brazil[J]. Sientibus Série Ciências Biológicas, 2007, 7(2): 163-169.
- [3] Segedin, BP. An annotated checklist of Agarics and Boleti recorded from New Zealand[J]. New Zealand Journal of Botany, 1987, 25(2): 185-215.
- [4] Bandala VM, Montoya L, Jarvio D. Two interesting records of Boletes found in coffee plantations in Eastern Mexico[J]. Persoonia, 2004, 18(3): 365-380.
- [5] Heinemann P, Rammeloo J. Observations sur le genre *Phlebopus* (Boletineae)[J]. Mycotaxon, 1982, 15(1): 384-404.

- [6] Watling R. The relationships and possible distributional patterns of Boletes in South-East Asia[J]. Mycological Research, 2001, 105(12): 1440-1448.
- [7] 纪开萍, 何明霞, 张春霞, 等. 暗褐网柄牛肝菌半人工模拟栽培及“宿主树”根系上菌丝生长的持久性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 377-382.
- [8] Sanmee R, Dell B, Lumyong P, et al. Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand[J]. Food Chemistry, 2003, 82(4): 527-532.
- [9] 纪开萍, 张春霞, 曾雁, 等. 盆栽条件下暗褐网柄牛肝菌人工菌塘及其子实体的培养[J]. 云南植物研究, 2007, 29(5): 554-558.
- [10] 张春霞, 纪开萍, 何明霞, 等. 暗褐网柄牛肝菌子实体营养成分分析[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2010, 32(6): 702-704.
- [11] 曹旻, 纪开萍, 刘静, 等. 瓶栽条件下覆土方法对暗褐网柄牛肝菌子实体生长的影响[J]. 食用菌学报, 2010, 17(3): 29-32.
- [12] 刘静, 纪开萍, 曹旻, 等. 对暗褐网柄牛肝菌菌丝生长有益细菌的筛选[J]. 食用菌学报, 2011, 18(2): 36-38.
- [13] Ahlawat OP, Rai RD. Bacterial inoculants and their effect on the pinning, yield and false truffle disease incidence in *Agaricus bitorquis*[J]. The International Society for Mushroom Science, 2000, 15(2): 695-699.
- [14] Zhu H, Qu F, Zhu LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(22): 5279-5280.
- [15] Mugin F, Thompson JD, Gouy M, et al. Multiple sequence alignment with ClustalX[J]. Trends Biochemical Sciences, 1998, 23(10): 403-405.
- [16] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. Briefings in Bioinformatics, 2008, 9(4): 299-306.
- [17] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [18] Hayes WA, Randle PE, Last FT. The nature of the microbial stimulus affecting sporophore formation in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing[J]. Annals Applied Biology, 1969, 64(1): 177-187.
- [19] Rainey PB. Effect of *Pseudomonas putida* on hyphal growth of *Agaricus bisporus*[J]. Mycological Research, 1991, 95(6): 699-704.
- [20] 杜爱玲, 王进涛, 陈立国, 等. 双孢蘑菇覆土层有益微生物消长规律[J]. 食用菌学报, 2001, 8(2): 50-52.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 x , 不用大写 X , 也不用 *Mean*。标准差用英文小写 s , 不用 *SD*。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 *SE*。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。