

中华散尾鬼笔的液体培养条件优化及生物安全性测定

杨 璞¹, 张晓波¹, 林连男¹, 张国财^{1*}, 张 杰^{2*}

(1. 东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040;

2. 东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:以中华散尾鬼笔为对象,以菌丝生物量为指标,通过单因素试验筛选了接种量、pH、温度、装液量等4种非营养因子对中华散尾鬼笔液体发酵的影响,优化了培养条件,并测定了中华散尾鬼笔正丁醇提取物水溶液对绿豆的他感作用及对斑马鱼的急性毒性。结果表明,中华散尾鬼笔液体发酵的优化培养条件为:培养温度25℃、pH中性、接种菌饼3片、装液量220 mL·瓶⁻¹,在此培养条件下,中华散尾鬼笔菌丝干重为0.66 g,较未优化之前增加了1倍。同时,中华散尾鬼笔正丁醇提取物水溶液对绿豆种子的发芽和胚轴芽的伸长均产生抑制效果,且随着提取物浓度的升高,绿豆发芽率和胚轴芽长均趋于下降,抑芽率显著升高($P < 0.05$);对斑马鱼的急性毒性试验结果表明,中华散尾鬼笔正丁醇提取物水溶液对斑马鱼96 h的致死中浓度LC₅₀为426.54 mg·L⁻¹,属于低毒。研究为中华散尾鬼笔的进一步研究和利用提供了参考和依据,为其作为微生物源农药提供了可能。

关键词:中华散尾鬼笔;液体培养;生物安全性测定;他感作用;急性毒性

中图分类号:S767

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2020)05-0139-05

Optimization of Liquid Culture Conditions and Biosafety Determination of *Lysurus mokusin*

YANG Jing¹, ZHANG Xiao-Bo¹, LIN Lian-nan¹, ZHANG Guo-cai^{1*}, ZHANG Jie^{2*}

(1. School of Forest, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: Taking *Lysurus mokusin* as the research object and using the mycelial biomass as an indicator, the effects of inoculum size, pH, temperature and liquid volume on the liquid fermentation were screened by single factor test, and the culture conditions were optimized. Then the allelopathic effect of *L. mokusin* n-butanol extract on mung bean and its acute toxicity to zebrafish were determined. The results showed that the optimal culture conditions for *L. mokusin* liquid fermentation were as followings: culture temperature: 25℃, pH: 7, number of inoculum fungus plugs: 3, and liquid volume: 220 mL per bottle. Under these culture conditions, the dry weight of biomass was 0.66 g, which was doubled compared with that before optimization. The n-butanol extract of *L. mokusin* had presented inhibitory effects on the germination of mung bean seeds and the growth of bean sprouts. The inhibitory effects increased with the increase of concentration. The acute toxicity test on zebrafish showed that the LC₅₀ of the extract to the zebrafish at 96 h was 426.54 mg/L, belonging to low toxicity. The results of this study would provide references for the further research and utilization of *L. mokusin*, as a microbial source fungicide.

Key words: *Lysurus mokusin*; liquid culture; biosafety determination; allelopathy; acute toxicity

收稿日期:2019-09-19 修回日期:2020-02-15

基金项目:内蒙古大兴安岭重点国有林管局项目(2018003);哈尔滨市科技创新人才项目(2017RALXJ010);中央财政林业科技推广示范项目(JTL[2016]13)。

作者简介:杨 璞。研究方向:微生物源农药,森林有害生物防治。E-mail:pheureonyang@nefu.edu.cn

*通信作者:张国财,博士,教授。研究方向:森林有害生物综合管理。E-mail:zhang640308@126.com

张 杰,副教授。研究方向:微生物学。E-mail:875817856@qq.com

中华散尾鬼笔(*Lysurus mokusin*)隶属真菌界担子菌亚门(Basidiomycotina)、腹菌纲(Gasteromycetes)、鬼笔目(Phallales)、笼头菌科(Clathraceae)、散尾鬼笔属(*Lysurus*)^[1-2],子实体为五棱柱形,因此又被称为五棱散尾鬼笔和棱柱散尾鬼笔,子实体顶端裂片内侧有暗褐色黏液孢体,气味恶臭。目前,已有研究证明中华散尾鬼笔提取物具有良好的杀虫抑菌活性,且固体培养基的配方和培养条件已基本明确^[3],但对中华散尾鬼笔液体培养条件的优化还未见报道。贺新生等^[4]采用大麦芽液体培养基对中华散尾鬼笔进行了液体培养,并用水蒸气蒸馏法提取了菌丝体抗菌活性物质,但其菌丝体产量很低,培养14~21 d后产量仅有 $100\sim120 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$,污染比率较高。此后,王瑞琦等^[5]通过在马铃薯葡萄糖液体培养基中添加多种无机盐离子,得到了有利于中华散尾鬼笔生长的加富培养基,大幅提升了中华散尾鬼笔的培养效率,且经此方法获得的液体发酵液表现出良好的抑菌效果。

在生物源农药的开发研究过程中,生物活性物质以及次生代谢产物相互组合而产生新的农药,对生态环境友好,且可避免人工合成带来的繁杂工序^[6]。他感作用的研究,可以增进生物安全性的研究,在实际的研究中,有关绿豆、小麦、水稻、菊科植物的化感作用很多^[7-8]。同时,作为试验模型的鱼类毒性试验有助于评估农药对水生生物的潜在毒性,从而可以尽早确定药物污染物的影响^[9]。用于水生生物毒性的评价的鱼类很多^[10],斑马鱼(*Danio rerio*)因其对环境的敏感性较高和易于维护和饲养的特点,常被作为毒性研究的模型生物。

本研究在前期研究基础之上,以菌丝生物量为指标,通过单因素试验筛选非营养因子(包括:接种量、pH、温度、装液量)等4种非营养因子对中华散尾鬼笔液体深层发酵的影响,优化了培养条件,并测定了中华散尾鬼笔正丁醇提取物水溶液对绿豆的他感作用及对斑马鱼的急性毒性,旨在为中华散尾鬼笔的进一步研究和开发利用提供参考和依据,为其作为微生物源农药提供可能。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及活化

中华散尾鬼笔菌种由东北林业大学森林保护学省重点实验室保藏于4℃,参考前期研究进行菌株的活化及固体培养^[3]。

1.2 液体培养基配制

液体培养基配方为:马铃薯 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、葡萄糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 MgSO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蛋白胨 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{V}_{\text{B}1}$ 0.05 g·L⁻¹、蒸馏水,调节pH后,121℃、100 kPa灭菌20 min后冷却备用。

1.3 中华散尾鬼笔液体深层发酵条件的优化

1.3.1 培养温度 设5个摇床培养温度梯度,分别设置为:19℃、22℃、25℃、28℃、31℃,每个梯度设置3个重复。分别接种2片菌饼至装有200 mL液体培养基(pH=5)的三角摇瓶中。将已接种好的液体培养置于不同培养温度的恒温摇床中,160 r·min⁻¹振荡培养14 d。14 d后用绢布过滤得菌丝体,45℃恒温烘干至恒重,分析天平称重,并记录^[11-12]。

1.3.2 培养基pH 依据中华散尾鬼笔液体培养基的配制方法,设置5个pH梯度,分别为:3、5、7、9、11,每个梯度设置3个重复。将已接种好的液体培养置于25℃,160 r·min⁻¹恒温摇床振荡培养14 d。称重如1.3.1所述。

1.3.3 接种量 控制变量为接种量,设5个接种量梯度,分别为:1、2、3、4、5片,每个梯度设置3个重复。接种相应片数的菌饼至装有200 mL液体培养基(pH=7)的三角摇瓶中。培养条件与称重如1.3.2所述。

1.3.4 摆瓶装液量 设5个摇瓶装液量梯度,分别为:80、120、160、200、240 mL·瓶⁻¹,每个梯度设置3个重复^[13]。分别接种3片菌饼至具有不同装液量(pH=7)的三角摇瓶中。培养条件与称重如1.3.2所述。

1.4 中华散尾鬼笔提取物的制备

依据1.3得到的中华散尾鬼笔液体发酵优化条件进行培养,14 d后用绢布滤去菌丝体,得中华散尾鬼笔培养液。将培养液与正丁醇按1:3料液比混合进行振荡提取,得到正丁醇提取液,旋转蒸发浓缩至稠膏状后,45℃烘干至恒重^[14],得中华散尾鬼笔正丁醇提取物,4℃避光密封保存,使用时用无菌水进行溶液。

1.5 中华散尾鬼笔提取物的生物安全性测定

1.5.1 提取物对绿豆的他感作用研究 挑选健康、大小均匀的绿豆,用75%乙醇进行表面消毒。消毒后,用无菌水冲洗3次,最后用灭菌滤纸吸干表面水分。将绿豆在不同浓度的中华散尾鬼笔提取物水溶液中浸泡4 h,使其充分吸胀。处理组中华散尾鬼笔提取物水溶液的浓度分别为8、16、32、64、128、256 mg·mL⁻¹,对照组为无菌水。在培养皿底面放入用等浓度提取物药液或无菌水浸湿的无菌滤纸,单个培养皿放入10颗绿豆,每个处理重复3次,用保鲜膜将培养皿密封包好,放在28℃培养箱中黑暗培养^[15]。培养期间,每24 h换气,并补充提取

物。培养24 h时计算发芽率,以胚根突破种皮为界,计算公式为:发芽率/%=发芽种子数/供试种子数×100。继续培养,待72 h时测量相应绿豆的胚轴芽长,计算抑芽率:抑芽率/%=(对照胚轴芽长平均值-处理胚轴芽长平均值)/对照胚轴芽长平均值×100。

1.5.2 提取物对斑马鱼急性毒性研究 参考魏勇超等^[16]的方法进行预试验。将中华散尾鬼笔提取物配制成5个浓度梯度:0.1、1.0、10、100、1 000 mg·L⁻¹,每个梯度设置3个重复。2 h后开始观察,观察48 h,记录斑马鱼中毒反应及死亡数量。试验结束后,求得使斑马鱼刚刚死亡、10%死亡和90%以上死亡的药液浓度,得到药液浓度范围。

正式试验:依据预试验结果,以LC₁₀(1 000 mg·L⁻¹)及LC₉₀(100 mg·L⁻¹)作为浓度区间上限和下限,按几何级数梯度共设置5个浓度梯度(100、178、316、562、1 000 mg·L⁻¹)和1个清水对照组,试验采用“半静态法”,每24 h更换1次药液试验^[17]。每组10尾,设3个重复。选用玻璃缸作为容器,鱼的容积负载率不超过1 g·L⁻¹,光照12~16 h,21℃~25℃,于试验开始2 h后进行观察,及时清除死鱼,并记录6、12、24、48、72、96 h的斑马鱼死亡情况^[18]。

1.6 统计方法

用Excel 2013软件进行后期数据的处理与分析,SPSS 20.0软件进行Probit分析以及单因素方差(ANOVA)分析^[19]。

2 结果与分析

2.1 中华散尾鬼笔液体发酵最佳条件的优化

2.1.1 培养温度 中华散尾鬼笔菌丝的生长随着培养温度的变化,呈现先上升后下降的趋势(图1)。当温度<18℃时,生长受到抑制;温度上升至25℃时长势最好,菌丝干重为0.3 g·200 mL⁻¹,当温度>28℃时,菌丝量下降。由此可见,中华散尾鬼笔液体发酵的最适温度为25℃。

2.1.2 培养基pH 在不同pH下培养的中华散尾鬼笔菌丝干重呈现先上升、后下降的趋势(图2),pH为5~7时,获得的菌丝量相对最多,菌丝干重最高(pH=7)可达0.38 g·200 mL⁻¹,且与强酸强碱条件下均差异显著($P<0.05$);当pH>9时,菌丝量急剧下降,趋于不生长。由此可见,弱酸性至中性培养条件更适于中华散尾鬼笔菌丝生长。

2.1.3 接种量 随着接种的菌饼片数的增加,菌丝干重先上升后基本处于稳定(图3)。接种菌饼片数为3片时,菌丝干重为0.39 g·200 mL⁻¹,且接种

中华散尾鬼笔菌饼片数为3、4、5的菌丝干重差异不显著($P>0.05$)。由此可见,当培养基体积为200 mL时,接种3片菌饼最适生长。

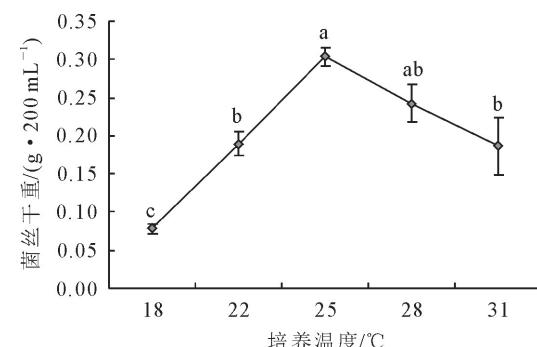


图1 不同培养温度对菌丝干重的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the dry weight of the mycelium

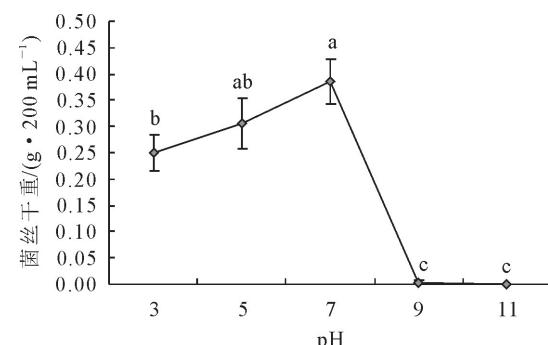


图2 不同培养基pH对菌丝干重的影响

Fig. 2 Effect of pH on the dry weight of mycelium

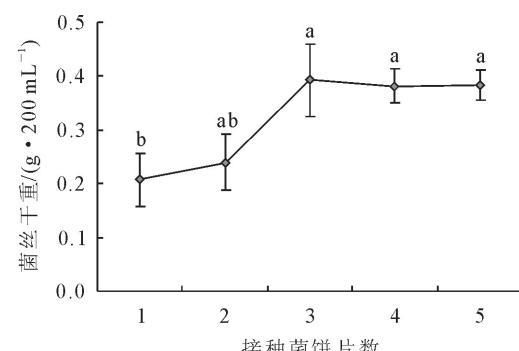


图3 不同接种量对菌丝干重的影响

Fig. 3 Effect of inoculation of dry weight of mycelium

2.1.4 摆瓶装液量 摆瓶装液量也影响菌丝的生长,菌丝干重随装液量的增加,呈现先上升后下降的趋势(图4)。其中,装液量为220 mL时获得的菌丝最多,干重可达0.66 g,约为装液量180 mL时菌丝干重的2倍,但与装液量260 mL差异并不显著($P>0.05$)。

2.2 中华散尾鬼笔提取物对绿豆的他感作用

经中华散尾鬼笔提取物处理24 h后,绿豆种子的发芽率随提取浓度的升高而降低(表1)。当中华散尾鬼笔提取物浓度<32 mg·mL⁻¹时,绿豆种子

的发芽率稳定在100%，并未受到影响；当提取物浓度达 $128\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，55%的种子发芽进程被抑制；当提取物浓度为 $256\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，绿豆种子的发芽率仅为30%。72 h时，经中华散尾鬼笔提取物处理的绿豆胚轴芽长<对照，提取物持续作用抑制豆芽生长（图5）。随着提取物浓度的升高，抑芽率也随之升高。当提取物浓度为 $32\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，胚轴芽长为35.47 mm，抑芽率可达44.49%；提取物浓度为 $256\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，抑芽率可达98.70%。

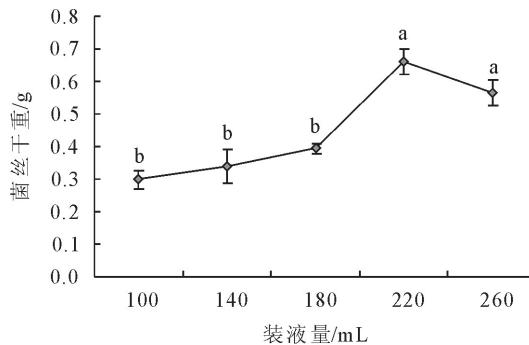


图4 不同装液量对菌丝干重的影响

Fig. 4 Effect of liquid volume of dry weight of mycelium

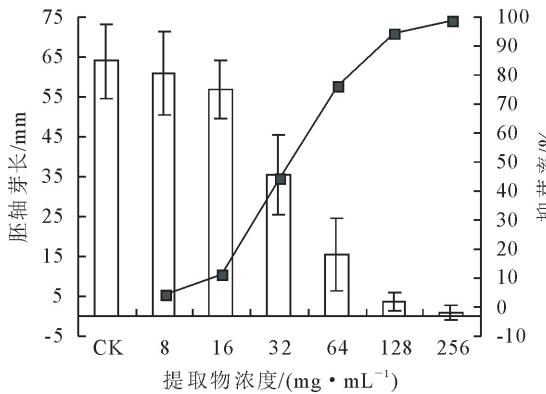


图5 提取物对绿豆胚轴芽长和抑芽率的影响

Fig. 5 Effects of *n*-propanol extract of *L. mokusin* on the growth and inhibition rate of *Vigna radiata*

表1 中华散尾鬼笔提取物不同浓度处理下的绿豆种子发芽率

Table 1 Germination rate of *Vigna radiata* seeds under different concentrations of *n*-propanol extract of *L. mokusin*

浓度/(mg·mL⁻¹)	CK	8	16	32	64	128	256
发芽率/%	100	100	100	100	85	55	30

2.3 对斑马鱼急性毒性试验

中华散尾鬼笔提取物药液对斑马鱼的毒性试验可以观察到，供试斑马鱼在接触较高浓度的提取物药液初期表现兴奋，游动速度显著加快，随着与药液接触时间的增加，斑马鱼开始对外界刺激反应迟钝，

伴随着身体倾斜失衡，几乎停滞在水中；最后，斑马鱼无可见运动，用玻璃棒轻触其尾部无反应，待其完全死亡时身体浮于水面，部分死亡斑马鱼出现脊柱弯曲、腹部充血且鱼肚皮变白的症状。

中华散尾鬼笔正丁醇提取物水溶液对斑马鱼的毒力与浓度呈正相关（表2）。其中，当中华散尾鬼笔提取物药液质量浓度达 $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，斑马鱼的校正死亡率达到100%；药液质量浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，药液对斑马鱼的毒性较低，其处理的校正死亡率只有2.38%。Probit分析结果见表3，中华散尾鬼笔提取物药液对斑马鱼的致死中浓度 LC_{50} 为 $426.54\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，提取物药液浓度对数与校正死亡率数值呈现线性相关，其回归方程为 $Y=3.835X-10.091$ ，95%的置信区间为 $367.354\sim501.128\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

根据我国水生生物农药毒性的分级标准^[18]，中华散尾鬼笔提取物对斑马鱼的 $\text{LC}_{50}=426.54\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，属低毒。

表2 中华散尾鬼笔提取物对斑马鱼的急性毒性
试验数据统计

Table 2 Results of acute toxicity test data of *n*-propanol extract of *L. mokusin* on *Danio rerio*

质量浓度/(mg·L⁻¹)	试验鱼数量/条	累计死亡数/条	死亡率/%	校正死亡率/%	平均死亡率/%	平均校正死亡率/%
1000	10	10	100	100	100	100
	10	10	100	100		
	10	10	100	100		
562	10	6	60	57.14	60	57.14
	10	6	60	57.14		
	10	6	60	57.14		
316	10	3	30	25.00	30	24.82
	10	2	20	14.28		
	10	4	40	35.71		
178	10	2	20	14.28	16.67	10.71
	10	1	10	3.57		
	10	2	20	14.28		
100	10	0	0	0	6.67	2.38
	10	1	10	3.57		
	10	1	10	3.57		
对照	10	1	10	6.67	—	—
	10	1	10			
	10	0	0			

表3 中华散尾鬼笔提取物对斑马鱼的96 h急性毒性

Table 3 Acute toxicity of *n*-propanol extract of *L. mokusin* to *Danio rerio* at 96 h

时间	毒力回归方程	R²	LC ₅₀ /(mg·L⁻¹)	95%置信区间/(mg·L⁻¹)
96 h	$Y=3.835X-10.091$	0.982	426.54	367.354~501.128

3 结论与讨论

中华散尾鬼笔分布地区广泛^[20],近年来,对于中华散尾鬼笔的研究日渐增多,包括形态学研究^[21]、分类学研究^[22]、活性物质的提取优化研究^[23]以及生物活性研究^[24]等。为了获得高质量的发酵液,在以往研究的基础上,本研究筛选了接种量、pH、温度、装液量等非营养因子对中华散尾鬼笔液体深层发酵的影响,优化了液体培养条件,并测定了中华散尾鬼笔提取物对绿豆他感作用及对斑马鱼的急性毒性。

王旭彤等^[25]研究发现最适宜大球盖菇(*Stropharia rugoso-annulata*)液体种最佳培养条件为转速140 r·min⁻¹,接种量8%,培养时间12 d,pH自然;韩冰等^[26]对香菇液体深层发酵优化进行了研究,结果表明接种量4片菌饼,25℃培养,摇床转速150 r·min⁻¹培养8 d时生长最为适宜;陈蒙蒙^[27]对3种野生食用真菌的驯化和培养特性进行了研究,发现马铃薯葡萄糖培养液适合作为粉托鬼笔(*Phallus hadrian*)的种子培养液,条件为温度26℃、转速150 r·min⁻¹时适合放罐。不同微生物对液体培养条件的要求不同,因此本研究针对中华散尾鬼笔实验室阶段的液体发表培养,依照培养温度、pH、接种量、装液量4个条件逐步进行优化,最终的优化培养条件为:培养温度25℃、pH中性、接种菌饼3片、装液量220 mL·瓶⁻¹。当温度<18℃,菌丝生长缓慢,温度>28℃,菌丝产量显著下降($P<0.05$);当培养液pH为弱酸到中性时,菌丝生长较好,pH>9时,菌丝几乎不生长,这是因为大多数酶促反应最适pH为4~8,pH太高影响了菌丝体的正常酶促反应,碱性条件下细胞膜的阴离子通行受到阻碍,且金属离子有可能在碱性条件下形成不可溶复合物,不利于菌丝生长;装液量在180~220 mL·瓶⁻¹,随着装液量增加,菌丝干重也随之增加,当装液量>220 mL·瓶⁻¹时,菌丝生长量出现下降,虽然摇瓶中的营养物质含量增多,但装液量过多造成培养液与空气的接触面积变小,培养液溶氧率下降,影响菌丝的生长。综上所述,最终优化条件培养的菌丝干重达到0.66 g是未优化之前0.3 g产量的2倍,菌丝生长量明显提高。

由之前中华散尾鬼笔提取物对灰葡萄孢菌的抑菌机制研究可以知道,提取物对灰葡萄孢菌的细胞壁、细胞膜、细胞正常代谢具有一定的影响作用^[28]。在此基础上,选取绿豆种子和斑马鱼,对中华散尾鬼笔提取物的生物安全性进行了测定。微生物本身或其次生代谢产物可能对绿豆种子的发芽和豆芽的生

长有促进或者抑制作用。试验结果表明,中华散尾鬼笔正丁醇提取物水溶液对绿豆种子的发芽和胚轴芽的伸长均产生抑制效果,且呈现浓度依赖型。当中华散尾鬼笔正丁醇提取物水溶液的浓度从32 mg·mL⁻¹增加至256 mg·mL⁻¹,绿豆的发芽率从100%下降至30%,供试药液的抑芽率从44.49%升高至98.70%。这表明,中华散尾鬼笔正丁醇提取物水溶液对绿豆种子和豆芽的毒力作用,与提取物浓度正相关。同时,中华散尾鬼笔正丁醇提取物水溶液对斑马鱼的急性毒性试验结果表明,提取物对斑马鱼96 h的致死中浓度LC₅₀为426.54 mg·L⁻¹,属于低毒,为其继续开发研究提供理论基础。

参考文献:

- [1] 图力古尔,包海鹰,李玉.中国毒蘑菇名录[J].菌物学报,2014,33(3):517-548.
- [2] 佚名.贵州常见毒菌[J].贵州林业科技,1985(4):25-42.
- [3] 杨璟,林连男,王瑞琦,等.中华散尾鬼笔培养基筛选及培养条件优化[J].西北林学院学报,2017,32(6):145-149.
YANG J,LIN L N,WANG R Q,*et al*. Screening and optimization of culture medium and conditions of *Lysurus mokusin*[J]. Journal of Northwest University. 2017, 32 (6): 145-149. (in Chinese)
- [4] 贺新生,黄倩倩,潘家莲,等.从鬼笔菌丝体和子实体中提取天然防腐物质研究[J].四川食品与发酵,2004,40(4):40-42.
- [5] 王瑞琦.中华散尾鬼笔组织分离、ITS序列及抑菌活性研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2017.
- [6] 郑丽,冯玉龙.紫茎泽兰叶片化感作用对10种草本植物种子萌发和幼苗生长的影响[J].生态学报,2005,25(10):2782-2787.
- [7] 郭怡卿,陆永良.水稻化感作用与杂草的生物防治[J].中国生物防治学报,2015,31(2):157-165.
GUO Y Q,LU Y L.Rice allelopathy to weed and weed biological control[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31 (2): 157-165. (in Chinese)
- [8] 陈锋,孟永杰,刘海威,等.植物化感物质对种子萌发的影响及其生态学意义[J].中国生态农业学报,2017,25(1):36-46.
CHEN F,MENG Y J,SHUAI H W,*et al*. Effect of plant allelochemicals on seed germination and its ecological significance [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2017, 25 (1): 36-46. (in Chinese)
- [9] INES BONANSEA R, ALBERTO WUNDERLIN D, VALERIA AME M. Behavioral swimming effects and acetylcholinesterase activity changes in *Jenynsia multidentata* exposed to chlorpyrifos and cypermethrin individually and in mixtures[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety,2016,129:311-319.
- [10] 吴声敢,陈丽萍,王彦华,等.4种杀菌剂对水生生物的急性毒性与安全性评价[Z].武汉:2009,6.
- [11] 刘勇,张长铠,李昆峰.金针菇FV088深层发酵工艺的研究[J].食品与发酵工业,1998(3):9-14.

(下转第158页)

- XU L J, HE Z P, XIE W, et al. Transmembrane H⁺ and Ca²⁺ fluxes through extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi in response to drought stress[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2018, 42(7): 764-773. (in Chinese)
- [31] RICHARD P P, INA C M, EMILY S B, et al. Roots and fungi accelerate carbon and nitrogen cycling in forests exposed to elevated CO₂[J]. Ecology Letters, 2012, 15: 1042-1049.
- [32] 壬夕容, 黄建国, 梁国仕. 接种双色蜡蘑对马尾松幼苗生长、养分和抗铝性的影响[J]. 林业科学, 2005, 41(4): 199-203.
- GU X R, HUANG J G, LIANG G S. Bacterial communities in boreal forest mushrooms are shaped both by soil parameters and host identity[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2005, 41(4): 199-203. (in Chinese)
- [33] 程国玲, 李培军, 王风友, 等. 几种纯培养外生菌根真菌对矿物油的降解效果[J]. 中国环境科学, 2003, 23(1): 75-77.
- [34] 周慧杰. 培养液 pH 对外生菌根真菌生长影响分析[J]. 中国食用菌, 2019, 38(8): 42-44.
- [35] VELUCHAM Y, SELVAKUMA R, WILLIAM S, et al. The CuZn superoxide dismutase from Sclerotinia sclerotiorum is involved with oxidative stress tolerance, virulence, and oxalate production[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology,
- 2012, 78: 14-23.
- [36] ALVAREZ M, HUYGENS D. Effect of ectomycorrhizal colonization and drought on reactive oxygen species metabolism of Nothofagus dombeyi roots[J]. Tree Physiology, 2009, 29(8): 1047-1057.
- [37] AGERER R. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae[J]. Mycological Progress, 2006, 5(2): 67-107.
- [38] 魏杰, 杨岳, 李树红, 等. 干巴菌物种复合群与云南松形成的外生菌根形态特征及分子鉴定[J]. 中国食用菌, 2018, 37(1): 14-18.
- [39] PENT M, PÖLDMAA K, BAHRAM M. Bacterial communities in boreal forest mushrooms are shaped both by soil parameters and host identity[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 836.
- [40] 袁志林, 潘雪玉, 靳微. 林木共生菌系统及其作用机制——以杨树为例[J]. 生态学报, 2019, 39(1): 381-397.
- YUAN Z L, PAN X Y, JING W. Tree-associated symbiotic microbes and underlying mechanisms of ecological interactions: a case study of poplar[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(1): 381-397. (in Chinese)

(上接第 143 页)

- [12] 郭清华, 熊本涛, 陈少林. 粗糙脉孢菌产纤维素酶培养条件的优化[J]. 西北林学院学报, 2018, 33(2): 151-155.
- GUO Q H, XIONG B T, CHEN S L. Optimization of cellulase production conditions of neurospora[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2018, 33(2): 151-155. (in Chinese)
- [13] 张文隽, 吴亚召, 雷萍, 等. 桑黄黄酮液体发酵培养条件的优化[J]. 中国食用菌, 2017, 36(2): 52-55.
- [14] 朴春红, 霍越, 李想, 等. 荞麦壳水提取物的抑菌活性[J]. 吉林农业大学学报, 2015, 37(4): 482-487.
- [15] 陈秋平. 三裂叶蟛蜞菊对绿豆的化感作用[J]. 杂草科学, 2014, 32(2): 18-19.
- [16] 魏勇超, 王彦华, 雷成琦, 等. 环境中多残留农药复合暴露对淡水绿藻和斑马鱼的联合毒性[J]. 环境工程, 2018, 36(11): 185-189.
- [17] 葛婧, 蒋金花, 蔡磊明. 3 种三唑类杀菌剂对斑马鱼的毒性研究[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(5): 744-755.
- [18] OECD. Test No. 203; Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 [EB/OL]. OECD Publishing, Paris, 2019, <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>.
- [19] 杨璟, 张国财, 胡春平, 等. 叶绿素降解产物二氢卟吩 e6 的合成及对尖孢镰刀菌的光敏抑制作用[J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(3): 270-275.
- [20] 郭鹏, 李峻志, 李安利, 等. 五棱散尾鬼笔——陕西省新发现简报[J]. 中国食用菌, 2014, 33(4): 12-13.
- [21] HOSAKA K, BATES S T, BEEVER R E, et al. Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclass phallomycetidae and two new orders[J]. Mycologia, 2006, 98(6): 949-959.
- [22] 王瑞琦, 张国财, 林连男, 等. 基于 ITS 中华散尾鬼笔的分类及抑菌活性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(23): 178-181, 299.
- [23] 林连男, 王瑞琦, 张国珍, 等. 中华散尾鬼笔提取工艺响应面优化及其粗提物毒力测定[J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(1): 80-84.
- [24] LIN L, YANG J, ZHANG G, et al. Extraction optimization of insecticidal compounds from *Lysurus mokusin* by response surface methodology [J]. Journal of Forestry Researsh, 2019, <https://doi.org/10.1007/s11676-019-00880-6>. (online version)
- [25] 王旭彤, 方释慧, 邹莉, 等. 大球盖菇培养基的筛选及培养条件的优化[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 240-247, 181.
- [26] 韩冰, 陈顺, 于广峰, 王洪奇, 冀宝营, 孙立梅, 关艳丽, 郭玲玲. 香菇液体深层发酵优化研究[J]. 食用菌, 2019, 41(4): 19-21.
- [27] 陈蒙蒙. 三种野生食药用真菌的驯化和培养特性研究[D]. 烟台: 鲁东大学, 2017.
- [28] 张晓波, 林连男, 张国财, 等. 中华散尾鬼笔提取物对灰葡萄孢霉菌的作用机制[J]. 吉林农业大学学报, 2019, 41(2): 161-167.