

木腐真菌的鉴定及对不同木材的腐朽能力

骆静怡, 傅威锐, 潘程远

(浙江农林大学 农业与食品科学学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 木腐真菌是一类木质纤维素的自然分解者, 在生态系统的物质循环中发挥着重要作用。利用真菌子实体、菌落、菌丝体和分生孢子形态, 结合内转录间隔区(ITS)和 26S rDNA D1/D2 区域序列, 对环境中采集到的木腐真菌进行鉴定, 并对分离鉴定到的真菌进行木质素酶和纤维素酶活性分析, 以及木材侵染腐朽能力研究。通过鉴定, 共分离得到 5 种木腐真菌, 分别是尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*, 毛栓孔菌 *Trametes hirsuta*, 层生镰刀菌 *Fusarium proliferatum*, 裂褶菌 *Schizophyllum commune* 和血红密孔菌 *Pycnoporus sanguineus*。酶活分析表明: 5 种真菌均表现出较高的漆酶和锰过氧化物酶活性, 但纤维素酶活性则普遍较低或不存在。利用质量损失法分析 5 种真菌对 6 种不同木材样品的生物降解能力, 12 周腐朽实验结果表明: 毛栓孔菌的木材腐朽能力较强, 造成对橡木 *Quercus mongolica* 最高的 69.16% 的质量损失率, 而尖孢镰刀菌、层生镰刀菌和裂褶菌等的木材腐朽能力较弱, 造成木材质量损失率普遍低于 3.00%, 血红密孔菌对不同木材的腐朽能力差异较大, 可造成 41.37% 的橡木质量损失率, 而对柚木 *Tectona grandis* 仅有 2.20%。通过分析酶活性和木材腐朽结果可以得出, 真菌木质纤维素酶活力和其木材腐朽能力不存在相关性, 即较高的酶活力并不代表其具有较强的木材腐朽能力。图 5 表 2 参 36

关键词: 木材科学与技术; 木腐真菌; 鉴定; 木质素酶; 纤维素酶; 木材腐朽

中图分类号: S782.33

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2015)01-0001-10

Identification of wood-rotting fungi and their decay capability in six wood species

LUO Jingyi, FU Weirui, PAN Chengyuan

(School of Agricultural and Food Science, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Wood-rotting fungi, one of the lignocellulose decomposers in nature, play an important role in the material cycle of the ecosystem. In order to clarify the relationship between wood decay capability of fungi and their lignocellulases activity, five kinds of wood-rotting fungi were identified in this study (namely *Fusarium oxysporum*, *Trametes hirsuta*, *Fusarium proliferatum*, *Schizophyllum commune*, and *Pycnoporus sanguineus*), based on morphological characteristics of sporophore, colony, mycelium, and conidium, and combined with sequences of internal transcribed spacer (ITS) and 26S rDNA D1/D2. Also, lignases and cellulases activities were determined from the wood-rotting fungi. Biodegradation capability of the fungi to six different species of wood, including oak (*Quercus mongolica*), teak (*Tectona grandis*), merbau (*Intsia bijuga*), Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*), Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and masson pine (*Pinus massoniana*), was evaluated through wood mass losses of pre- and post-treatments. Results showed that for all five species of fungi, laccase and manganese peroxidase exhibited higher activities than cellulases. After 12 weeks of the decay experiment, *T. hirsuta* caused the most decay with oak (mass loss of 69.16%). *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, and *S. commune* caused less than 3.00% mass loss with all six species of wood; whereas *P.*

收稿日期: 2014-02-17; 修回日期: 2014-05-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31301923); 浙江农林大学大学生创新创业基金资助项目(201201012)

作者简介: 骆静怡, 从事木腐真菌研究。E-mail: 123973358@qq.com。通信作者: 潘程远, 副教授, 博士, 从事木材抗虫防腐研究。E-mail: cypan@zafu.edu.cn

sanguineus caused 41.37% mass loss with oak but only 2.20% mass loss with teak. When comparing wood decay capability of fungi and lignocellulases activity, higher lignases and cellulases activity of the fungus did not mean it had higher decay capability on the wood.[Ch, 5 fig. 2 tab. 36 ref.]

Key words: wood science and technology; wood-rotting fungi; identification; lignases; cellulases; wood decay

木腐真菌, 即木材腐朽真菌, 是一类能降解木质纤维素的生物体, 作为生态系统中的分解者, 在物质循环方面有着极为重要的作用。在中国, 目前已分离鉴定到 1 200 余种木腐真菌^[1-4]。按分类学地位, 木腐真菌主要属于担子菌亚门 Basidiomycotina 非褶菌目 Polyporales 子囊菌门 Ascomycota 盘菌纲 Discomycetes 和半知菌类的部分真菌^[5]。从木材腐朽类型来看, 木腐真菌可分为白腐真菌、褐腐真菌和软腐真菌, 其中, 白腐真菌为最主要的木材腐朽菌, 约占已知种类的 90%^[6]。木腐真菌对木材的腐朽, 源于其能分泌木质素酶和纤维素酶, 将木材细胞壁中的木质纤维素降解成低分子物质, 并摄取这些物质作为养分和能源, 供其生长和繁殖。不同种类的木腐真菌, 其所分泌酶的种类和活性有所不同。黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 作为一种白腐真菌, 其体内具备降解木质纤维素所有的相关基因^[7], 但最被人们熟知的是其体内高活性的木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶^[8]。同样作为木质纤维素降解体系中研究较多的云芝栓孔菌 *Trametes versicolor*, 其分泌的木质纤维素酶主要是漆酶和锰过氧化物酶^[9-10]。正因为不同木腐真菌具有不同的酶系及活力, 使得它们对木材的侵染和分解能力各不相同^[11-12]。木腐真菌作为自然界的分解者发挥着巨大的作用, 但是对于木材的使用, 却造成了巨大的经济损失。本研究将对原木中采集的木腐真菌进行分离鉴定, 测定各种菌种木质素酶(包括漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶)和纤维素酶(包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶)的活性, 同时比较菌种对 6 种家居常用木材柚木 *Tectona grandis*, 橡木 *Quercus mongolica*, 菠萝格 *Intsia bijuga*, 杉木 *Cunninghamia lanceolata*, 花旗松 *Pseudotsuga menziesii* 和马尾松 *Pinus massoniana* 等的腐朽能力, 分析木腐真菌木质纤维素酶酶活与其木材侵染能力的关系, 为扩展木腐真菌种质资源、木材保护以及今后木腐真菌的利用提供有用信息。

1 材料与方法

1.1 菌种采集、分离与保存

2012 年 12 月 12 日, 在浙江省临安市马溪木材厂采集木腐真菌子实体, 分别装于 1.5 mL 离心管中, 并拍照记录。通过组织分离法, 在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基中分离得到 5 个菌株, 编号为 MX1, MX2, MX3, MX4 和 MX5, 并保存于浙江农林大学植物保护学科微生物实验室。

1.2 菌种鉴定

1.2.1 菌种形态与显微观察 挑取 PDA 上培养的真菌菌丝制作临时载玻片, 灭菌水作为介质, 在 10×40 倍显微镜下观察菌丝、分生孢子及厚壁孢子的形态, 用 DS-Ri1 数码相机(Nikon)进行显微拍照。MX1 菌株的显微结构为 PDA 上培养 30 d 的菌丝体, MX2, MX3, MX4 和 MX5 菌株的显微结构为 PDA 上培养 8 d 的菌丝体。

1.2.2 菌种内转录间隔区(ITS)及 D1/D2 序列分析 分别挑取 PDA 上培养 8 d 的 MX1, MX2, MX3, MX4 和 MX5 菌丝体, 用 EZ-10 Spin Column Fungal DNA Isolation Kit(生工生物)提取其基因组 DNA, 以提取的 DNA 为模板, 用 Fungi Identification PCR Kit(TaKaRa)试剂盒聚合酶链式反应(PCR)扩增菌丝体基因内转录间隔区(ITS)序列和 26S rDNA D1/D2 区域序列。PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳分离后, 用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(Axygen)回收目的条带, 对回收的 DNA 片段进行测序。

1.3 粗酶液制备

刮取在 PDA 上培养 14 d 后的木腐真菌菌丝, 加蒸馏水研磨, 将研磨液离心($1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min, 4 ℃)得到的上清液作为粗酶液。该粗酶液用于测定木质素酶和纤维素酶的活力。

1.4 粗酶液总蛋白质质量分数测定

取上述各种真菌粗酶液用于总蛋白质质量分数测定。运用 Bradford 原理, 使用蛋白质定量检测试剂

盒(生工生物)进行蛋白测定。

1.5 木质素酶活力测定

1.5.1 漆酶 用 ABTS(Sigma)的氧化来表示漆酶的活性。其 1.0 mL 反应体系为：900 μL 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)和 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液(pH 5.0)，加入 100 μL 粗酶液，启动反应，测定反应 3 min 内 420 nm 处吸光度的变化^[13]。以 1 min 转化 1 μmol ABTS 所需的酶量来表示 1 个酶活力单位($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)。

1.5.2 锰过氧化物酶 在锰和过氧化氢存在下氧化 2, 6-二甲氧基苯酚(DMP, Sigma)来表示锰过氧化物酶的活性。其 1.0 mL 反应体系中含 100.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 酒石酸钠缓冲液(pH 4.5)，1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMP，1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸锰和 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢，在加入 100 μL 粗酶液后启动反应体系，测定 3 min 内 469 nm 处吸光度的变化^[14]。以 1 min 转化 1 μmol DMP 所需的酶量来表示 1 个酶活力单位($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)。

1.5.3 木质素过氧化物酶 在过氧化氢存在下氧化藜芦醇(Sigma)来表示木质素过氧化物酶的活性。其 1.0 mL 反应体系中含 10.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 酒石酸钠缓冲液 (pH 3.0)，2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 藜芦醇和 0.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢，在加入 100 μL 粗酶液后启动反应体系，测定 3 min 内 310 nm 处吸光度的变化^[14]。以 1 min 转化 1 μmol 藜芦醇所需的酶量来表示 1 个酶活力单位($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)。

1.6 纤维素酶活力测定

1.6.1 内切葡聚糖酶 以羧甲基纤维素(CMC, Sigma)为底物，反应产生的还原糖来表示内切葡聚糖酶的活性。在 50.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液(pH 5.0)配制成的 900 μL 1%(w·v⁻¹)羧甲基纤维素(CMC)溶液中加入 100 μL 粗酶液，于 32 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min，然后在 CMC 溶液中加入等体积(1.0 mL)的 3,5-二硝基水杨酸(DNS 试剂)，于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min，再于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 15 min，最后恢复室温，测定 540 nm 下的吸光度^[15]。用 1 min 所产生 1 μg 还原糖的量来表示 1 个酶活力单位($\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$)。

1.6.2 外切葡聚糖酶 以 4-nitrophenyl β -D-cellobioside(pNPC, Sigma)氧化成对硝基酚的能力来表示外切葡聚糖酶的活性。在 900 μL 含 10.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNPC 和 100.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液(pH 5.0)中加入 100 μL 粗酶液，于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 15 min，测定 415 nm 处的吸光度^[16-17]。用 1 min 产生 1 μmol 对硝基酚来表示 1 个酶活力单位($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)。

1.6.3 β -葡萄糖苷酶 以 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(pNPG, Sigma)氧化成对硝基酚的能力来表示 β -葡萄糖苷酶的活性。在 900 μL 含 10.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNPG 和 100.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液(pH 5.0)中加入 100 μL 粗酶液，于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 15 min，测定 415 nm 处的吸光度^[17]。以 1 min 产生 1 μmol 对硝基酚所需的酶量来表示 1 个酶活力单位($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)。

1.7 木材侵染能力测定

在无菌条件下，将上述分离得到的 5 种木腐真菌分别接种到 9 cm 的 PDA 平板培养皿中，接种后置 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 8 d，使菌种长满平板或基本长满平板。

从临安市马溪木材厂取得未经处理的柚木、橡木、菠萝格、杉木、花旗松和马尾松等的边材加工成 18 mm $\times$ 18 mm $\times$ 3 mm 大小样品，并给每块木材样品编号，放入温度为 103 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干 6 h，每块木材样品用电子天平称量(精确到 0.001 g)。然后将木材样品包好在高压灭菌锅中灭菌(120 $^{\circ}\text{C}$ ，20 min)。在无菌条件下，将木块置于长满菌丝的平板培养基内，放木材样品 1 块 $\cdot$ 培养基⁻¹，重复 3 次 $\cdot$ 样品⁻¹，然后将培养皿放入 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中，12 周后，取出附带菌丝体的木块，除去表面的菌丝，放入 103 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干 6 h，称量。计算木材样品受菌侵染后的质量损失百分率，以百分数计算表示。计算公式为：试样质量损失百分率(%)=(W_1-W_2) $\div$ $W_1\times 100\%$ 。其中： W_1 为木块样品试验前的干质量， W_2 为木块样品试验后的干质量。

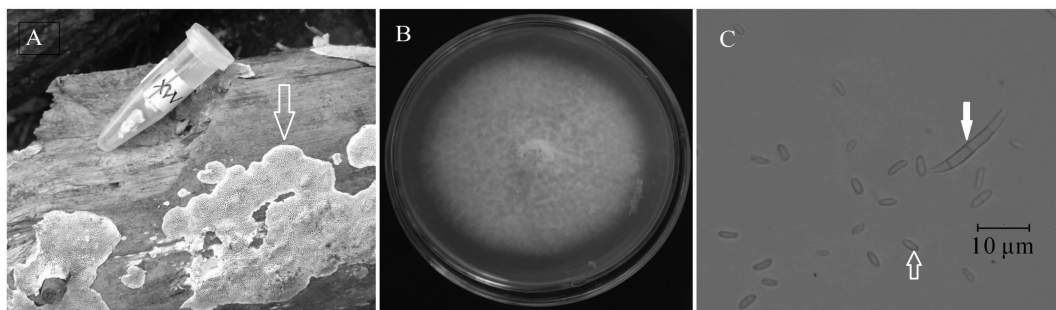
1.8 数据分析

木质纤维素酶在 5 种木腐真菌中的活性差异以及 5 种木腐真菌对木材侵染能力的差异运用方差进行分析(Newman-Keuls)，其显著水平 $\alpha=0.05$ 。数据分析所使用的分析软件为 SPSS 16.0 (SPSS Inc)。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定

2.1.1 MX1 菌株 MX1 菌株腐生在杨树储木上, 图 1A 为采集地储木上菌株子实体(箭头所指), 易与物剥离, 灰白色, 平伏, 贴生。图 1B 为该菌从子实体上分离纯化后, 在 25 °C 下培养 8 d 的菌落, 菌丝起初为白色, 随着培养天数的增加, 扩散性色素积累, 变为红色至暗红色。显微结构观察到 2 种分生孢子, 大孢子(图 1C 实心箭头)和小孢子(图 1C 空心箭头)。大孢子细长, 镰刀形, 有 3 个隔, 大小约为 $20.0\ \mu\text{m} \times 1.5\sim 2.5\ \mu\text{m}$; 小孢子形态多样, 有卵形、肾形、圆柱形, 大小约为 $2.5\sim 5.0\ \mu\text{m} \times 1.0\sim 1.5\ \mu\text{m}$ 。测序结果发现: MX1 菌株 ITS 序列和 26S D1/D2 区域序列长度分别为 544 bp 和 606 bp(GenBank 登录号分别为 KF513162 和 KF513167), 经美国国家生物技术信息中心(NCBI)快速局域序列比对排列算法(BLAST)比对后发现 MX1 菌株 ITS 序列与已知尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* ITS 序列(GenBank 登录号 JF776163)完全一致; MX1 菌株 D1/D2 序列与已知尖孢镰刀菌 D1/D2 序列(GenBank 登录号 KF181210)完全一致。尖孢镰刀菌可以产生大孢子、小孢子和厚壁孢子等 3 种无性分生孢子, 大孢子为两头尖, 大小 $20\sim 30\ \mu\text{m}$ 的镰刀状, 小孢子为椭圆形, 而厚壁孢子一般在黑暗或逆境中才会出现^[18]。综合 MX1 菌株的子实体、分生孢子种类和形态、ITS 序列和 26S D1/D2 序列比对结果, 可以确定 MX1 菌株为尖孢镰刀菌。

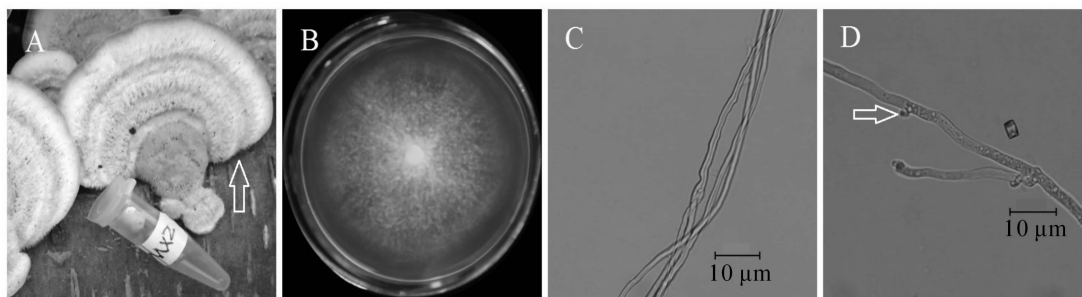


A. 采集地寄主木材中尖孢镰刀菌子实体; B. PDA 上培养 8 d 尖孢镰刀菌菌落形态; C. PDA 上培养 30 d 尖孢镰刀菌大孢子(实心箭头)和小孢子(空心箭头)形态。

图 1 尖孢镰刀菌(MX1)形态学特征

Figure 1 Morphological characteristics of *Fusarium oxysporum*

2.1.2 MX2 菌株 MX2 号菌株腐生在泡桐木原木上, 图 2A 为采集地原木上菌株子实体(箭头所指), 无柄盖形, 菌盖扁平, 表面白色中带浅棕黄色, 半圆形或扇形, 被厚绒毛, 有明显同心环带。目前, 木腐真菌的鉴定大多以子实体形态来进行判定, 该菌株的子实体形态与毛栓孔菌子实体形态极为相似^[19]。图 2B 为该菌在 25 °C 下培养 8 d 的菌落, 菌丝白色, 不产生扩散性色素, 有严重腐烂臭味。随着培养天数增加, 菌丝越来越茂盛, 越长越厚, 几十天之后, 可形成团块状实心菌丝球, 并且菌丝体易从培养基上



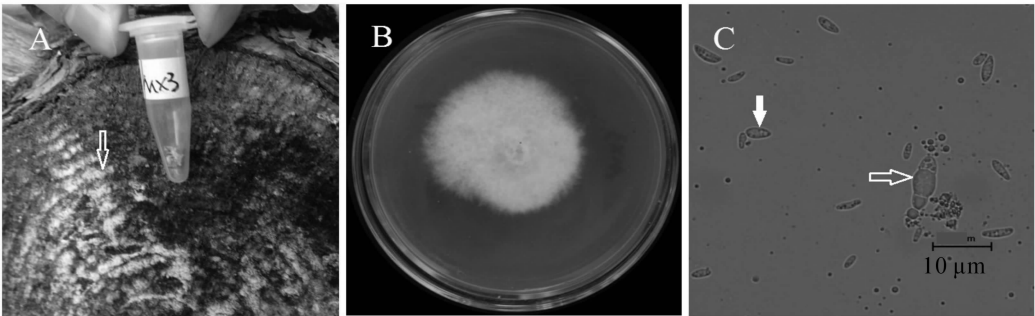
A. 采集地寄主木材中毛栓孔菌子实体; B. PDA 上培养 8 d 毛栓孔菌菌落形态; C. PDA 上培养 8 d 毛栓孔菌骨架菌丝形态; D. PDA 上培养 8 d 毛栓孔菌生殖菌丝和锁状联合(空心箭头)形态。

图 2 毛栓孔菌(MX2)形态学特征

Figure 2 Morphological characteristics of *Trametes hirsuta*

撕落。显微结构观察到 2 种菌丝形态，图 2C 中菌丝不分枝，细长，图 2D 中菌丝具有锁状联合(图 2D 箭头)。从显微结构的 2 种菌丝形态，可以推测 MX4 号是担子菌门的真菌。图 2C 中不分枝的菌丝为骨架菌丝，图 2D 中具有锁状联合的菌丝为生殖菌丝。测序结果发现，MX2 菌株 ITS 序列和 26S D1/D2 区域序列长度分别为 628 bp 和 645 bp(GenBank 登录号分别为 KF513163 和 KF513168)，经 NCBI BLAST 比对后发现 MX2 菌株 ITS 序列与已知毛栓孔菌 *Trametes hirsuta* ITS 序列(GenBank 登录号 AB733170)相似度达到 99%；MX2 菌株 D1/D2 序列与已知毛栓孔菌 D1/D2 序列(GenBank 登录号 AB733343)完全一致。综合 MX2 菌株子实体、菌落形态、菌丝显微结构、ITS 序列和 26S D1/D2 序列比对结果，可以确定 MX2 菌株为毛栓孔菌。

2.1.3 MX3 菌株 MX3 号菌株腐生在松木上，图 3A 为采集地原木上该菌株子实体(图 3A 箭头所指的白色物质)，白色，平伏，贴生。图 3B 为该菌在 25℃下培养 8 d 的菌落，菌丝白色，生长茂盛，无腐烂臭味，培养 10 d 左右，培养基底部可见黄色或红紫色扩散性色素。显微结构观察到 2 种孢子，分生孢子和厚壁孢子。分生孢子卵形至椭圆形(图 3C 实心箭头)，大小为 2.0~5.0 μm × 0.5~1.5 μm，并且产孢量大；厚壁孢子卵圆形(图 3C 空心箭头)，有分隔，大小为 8.0~9.0 μm × 1.5~4.0 μm。测序结果发现：MX3 菌株 ITS 序列和 26S D1/D2 区域序列长度分别为 558 bp 和 606 bp(GenBank 登录号分别为 KF513164 和 KF513169)，经 NCBI BLAST 比对后发现 MX3 菌株 ITS 序列与已知层生镰刀菌 *Fusarium proliferatum* ITS 序列(GenBank 登录号 HQ380763)完全一致；MX3 菌株 D1/D2 序列与已知层生镰刀菌 D1/D2 序列(GenBank 登录号 HQ382533)完全一致。该菌株菌落中心红紫色色素以及小分生孢子形态与层生镰刀菌的菌落及小孢子描述相似^[20]。综合 MX3 菌株子实体、菌落形态、分生孢子种类和形态、ITS 序列和 26S D1/D2 序列比对结果，可以确定 MX3 菌株为层生镰刀菌。

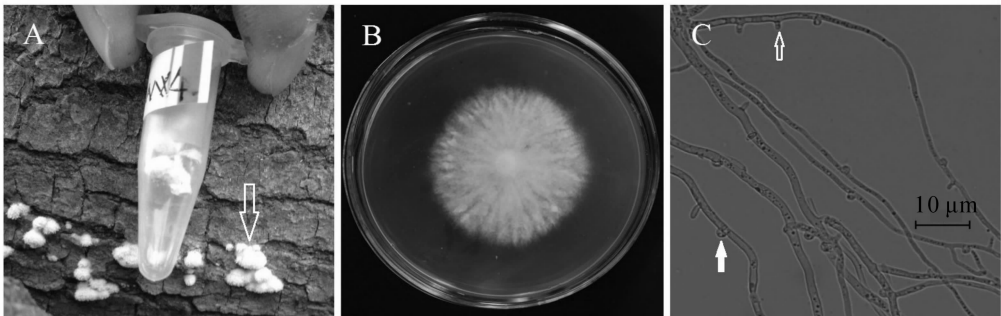


A. 采集地寄主木材中层生镰刀菌子实体；B. PDA上培养8 d层生镰刀菌菌落形态；C. PDA上培养8 d层生镰刀菌分生孢子(实心箭头)和厚垣孢子(空心箭头)形态。

图 3 层生镰刀菌(MX3)形态学特征

Figure 3 Morphological characteristics of *Fusarium proliferatum*

2.1.4 MX4 菌株 MX4 菌株腐生在杨树原木上。图 4A 为采集地原木上菌片子实体(箭头所指)，菌盖扇形，菌肉白色，此形态与裂褶菌子实体相似^[19]。图 4B 为该菌在 25℃下培养 8 d 的菌落，菌丝白色，生



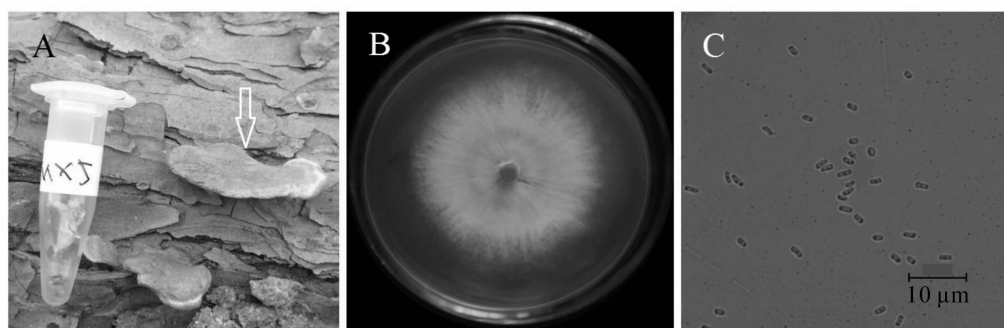
A. 采集地寄主木材中裂褶菌子实体；B. PDA上培养8 d裂褶菌菌落形态；C. PDA上培养8 d裂褶菌菌丝、锁状联合(实心箭头)和针状体(空心箭头)形态。

图 4 裂褶菌(MX4)形态学特征

Figure 4 Morphological characteristics of *Schizophyllum commune*

长茂盛,不易衰老,有腐烂臭味。随着培养天数增加,菌丝不断连接与分化,2~3 个月后能在培养基上形成黄色、表面裂褶的蘑菇。该菌菌丝显微结构具有锁状联合(图 4C 实心箭头),且沿着菌丝两侧长有针状体(图 4C 空心箭头)。从显微结构的锁状联合特征,可以推测 MX4 号是担子菌门的真菌,图 4C 中具有锁状联合的菌丝为生殖菌丝。生殖菌丝的锁状联合以及针状突是裂褶菌菌丝的典型结构^[21],该菌株菌丝均具有这 2 种形态,可以初步判定其为裂褶菌。测序结果进一步发现, MX4 菌株 ITS 序列和 26S D1/D2 区域序列长度分别为 636 bp 和 645 bp(GenBank 登录号分别为 KF513165 和 KF513170),经 NCBI BLAST 比对后发现 MX4 菌株 ITS 序列与已知裂褶菌 *Schizophyllum commune* ITS 序列(GenBank 登录号 JX848644)完全一致; MX4 菌株 D1/D2 序列与已知裂褶菌 D1/D2 序列(GenBank 登录号 AB428351)完全一致。综合 MX4 菌株子实体、菌落形态、菌丝显微结构、ITS 序列和 26S D1/D2 序列比对结果,可以确定 MX4 菌株为裂褶菌。

2.1.5 MX5 菌株 MX5 菌株腐生在松木上。图 5A 为采集地原木上该菌株子实体(箭头所指),菌盖扇形扁平,菌肉红色,此形态与血红密孔菌子实体形态极为相近^[19]。图 5B 为该菌在 25 ℃培养 8 d 的菌落,将培养基上白色物质刮下,在显微结构下观察,发现只有大量孢子,并没有菌丝。该菌株菌丝分布在培养基内部,培养基表面无菌丝。图 5C 为分生孢子,圆柱形或椭圆形,大小为 $1.5\sim 2.5\ \mu\text{m} \times 0.5\sim 1.0\ \mu\text{m}$ 。测序结果发现, MX5 菌株 ITS 序列和 26S D1/D2 区域序列长度分别为 636 bp 和 645 bp(GenBank 登录号分别为 KF513166 和 KF513171),经 NCBI BLAST 比对后发现 MX5 菌株 ITS 序列与已知血红密孔菌 *Pycnoporus sanguineus* ITS 序列(GenBank 登录号 HQ891297)完全一致; MX5 菌株 D1/D2 序列与已知血红密孔菌 D1/D2 序列(GenBank 登录号 HM595619)完全一致。综合 MX5 菌株子实体、菌落形态、分生孢子形态、ITS 序列和 26S D1/D2 序列比对结果,可以确定 MX5 菌株为血红密孔菌。



A. 采集地寄主木材中血红密孔菌子实体; B. PDA 上培养 8 d 血红密孔菌菌落形态;
C. PDA 上培养 8 d 血红密孔菌分生孢子形态。

图 5 血红密孔菌(MX5)形态学特征

Figure 5 Morphological characteristics of *Pycnoporus sanguineus*

2.2 木腐真菌木质纤维素酶活性

由表 1 可以看出: 5 种木腐真菌木质纤维素酶活性存在较大差异, 其中, 木质素酶活性普遍高于纤维素酶活性。漆酶和锰过氧化物酶在 5 种真菌中均有表达, 其中, 漆酶在尖孢镰刀菌和层生镰刀菌中活性最高, 分别达到 501.19 和 $295.73\ \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$; 锰过氧化物酶在层生镰刀菌和血红密孔菌中活性最高, 分别达到 247.11 和 $241.39\ \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$; 木质素过氧化物酶仅在裂褶菌中有少量活性, 而在其余 4 种真菌均未检测到活性(表 1)。内切葡聚糖酶分别在毛栓孔菌、层生镰刀菌和裂褶菌中检测到活性, 其中在毛栓孔菌中活性最高, 达到 $100.38\ \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$; 外切葡聚糖酶仅在毛栓孔菌和层生镰刀菌中有较低活性, 而在其余 3 种真菌中未检测到活性; β -葡萄糖苷酶除了在尖孢镰刀菌中未检测到活性外, 其余四种真菌均有活性(表 1)。总体而言, 毛栓孔菌、层生镰刀菌、裂褶菌和血红密孔菌均表现出木质素酶和纤维素酶活性, 而尖孢镰刀菌仅呈现出木质素酶活性。

2.3 木材侵染能力分析

从木材样品真菌侵染前后质量损失率可以进一步得出(表 2), 毛栓孔菌对 6 种木材造成的质量损失均显著高于其他 4 种木腐真菌, 其中除了对菠萝格造成 2.21% 质量损失外, 对其他 5 种木材样品均造成

表 1 PDA 培养 14 d 后 5 种木腐真菌木质纤维素酶活性

Table 1 Lignocellulolytic activities of *Fusarium oxysporum*, *Trametes hirsute*, *Fusarium proliferatum*, *Schizophyllum commune* and *Pycnoporus sanguineus* on PDA after fourteen days

酶	不同木腐真菌木质纤维素酶活性/($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	尖孢镰刀菌	毛栓孔菌	层生镰刀菌	裂褶菌	血红密孔菌
漆酶	501.19 $\pm$ 4.79 a	65.84 $\pm$ 5.24 d	295.73 $\pm$ 0.51 b	10.75 $\pm$ 0.07 e	140.50 $\pm$ 0.18 c
锰过氧化物酶	31.05 $\pm$ 1.10 b	10.54 $\pm$ 0.37 c	247.11 $\pm$ 9.59 a	23.91 $\pm$ 0.65 b	241.39 $\pm$ 8.57 a
木质素过氧化物酶	—	—	—	2.17 $\pm$ 0.16	—
内切葡聚糖酶	—	100.38 $\pm$ 0.65 a	45.50 $\pm$ 5.01 ab	23.07 $\pm$ 4.84 b	—
外切葡聚糖酶	—	3.47 $\pm$ 0.65 b	6.92 $\pm$ 0.60 a	—	—
β -葡萄糖苷酶	—	5.42 $\pm$ 0.62 ab	6.08 $\pm$ 0.99 a	0.69 $\pm$ 0.09 c	4.75 $\pm$ 0.57 b

说明：粗酶液总蛋白(内切葡聚糖酶)的单位为 $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 。表格中同行相同英文字母表示酶活性不存在显著性差异($\alpha=0.05$, SPSS), $n=3$; 外切葡聚糖酶 “—” 表示未检测到活性。

20.00% 以上的质量损失；血红密孔菌对菠萝格的侵染能力类似于毛栓孔菌，对橡木和杉木的侵染能力仅次于毛栓孔菌，但显著强于其他 3 种真菌，造成的质量损失率分别达到 41.37% 和 14.08%；尖孢镰刀菌、层生镰刀菌和裂褶菌对 6 种木材样品的侵染能力显著弱于毛栓孔菌，其造成的木材质量损失率普遍低于 3%。

表 2 木腐真菌侵染 12 周后不同木材的质量损失率

Table 2 Weight losses of *Tectona grandis*, *Quercus mongolica*, *Intsia bijuga*, *Cunninghamia lanceolata*, *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus massoniana* after twelve weeks of wood-rotting fungus exposure

木材名称	不同木腐真菌的质量损失率/%				
	尖孢镰刀菌	毛栓孔菌	层生镰刀菌	裂褶菌	血红密孔菌
柚木	1.99 $\pm$ 0.30 b	31.03 $\pm$ 3.91 a	1.52 $\pm$ 0.11 b	1.88 $\pm$ 0.11 b	2.2 $\pm$ 0.19 b
橡木	2.24 $\pm$ 0.16 c	69.16 $\pm$ 7.93 a	1.99 $\pm$ 0.29 c	2.18 $\pm$ 0.37 c	41.37 $\pm$ 28.39 b
菠萝格	0.99 $\pm$ 0.62 b	2.21 $\pm$ 0.21 a	0.58 $\pm$ 0.40 b	0.9 $\pm$ 0.25 b	2.52 $\pm$ 0.95 a
杉木	0.00 $\pm$ 0.00 c	26.23 $\pm$ 9.76 a	-1.13 $\pm$ 0.35 c	0.61 $\pm$ 0.29 c	14.08 $\pm$ 4.40 b
花旗松	2.23 $\pm$ 0.81 b	25.78 $\pm$ 19.20 a	1.69 $\pm$ 1.24 b	2.50 $\pm$ 0.27 b	9.19 $\pm$ 6.53 b
马尾松	0.84 $\pm$ 0.40 b	20.51 $\pm$ 5.52 a	0.60 $\pm$ 0.40 b	1.00 $\pm$ 0.43 b	5.34 $\pm$ 0.62 b

说明：表格中同行相同英文字母表示木材质量损失率不存在显著性差异($\alpha=0.05$)， $n=3$ 。

3 讨论

通过真菌子实体、菌落、菌丝体和分生孢子形态，结合 ITS 及 26s rDNA D1/D2 序列，本研究共鉴定出 5 种真菌，其中 3 种属于担子菌门非褶菌目，分别是毛栓孔菌、裂褶菌和血红密孔菌；2 种属于子囊菌门镰刀菌属，分别是尖孢镰刀菌和层生镰刀菌。毛栓孔菌是最常见的一种木材腐朽菌，能腐生在阔叶树和针叶树原木上，造成木材白色腐朽^[1]。裂褶菌是分布较广的一种木材腐朽菌，能腐生在阔叶树储木上，造成木材白色腐朽^[19]。血红密孔菌能腐生在多种阔叶树储木上，造成木材白色腐朽^[6]。层生镰刀菌是粮食作物中常见的病原菌(特别是玉米 *Zea mays*)，能产生一系列的真菌毒素，影响粮食生产与安全^[22]，但也有研究表明：该菌种是引起中国杨树 *Populus* 湿心材的一种病原真菌^[23]，其具备木质素降解能力^[24]。尖孢镰刀菌广泛存在于土壤中，可侵染植物的一种兼性寄生真菌，能对许多寄主植物造成病害^[25]。本研究中的尖孢镰刀菌虽是从 MX1 菌株分离所得，但从子实体外观形态推测，该菌应该只是与子实体菌株共生的一种真菌。

毛栓孔菌普遍用于木质素的降解研究，其体内具备高活性的漆酶，锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶^[26]，但也有研究表明，毛栓孔菌体内具备一定的纤维素酶^[27]。本研究中分离到的毛栓孔菌具备木质素和纤维素降解相关的酶(除了木质素过氧化物酶)，虽然该菌木质纤维素酶活性在 5 种真菌中不突出，但其对不同木材的侵染腐朽能力显著强于其余 4 种真菌，说明该菌适应能力强，能腐朽不同化学成分和结构的木材，能在多种木材上生长。

血红密孔菌是一种被广泛用于产漆酶及其应用研究的真菌^[28-30]。本研究分离到的血红密孔菌也同样表现出较高的漆酶活性,同时也检测到锰过氧化物酶和 β -葡萄糖苷酶的活性。血红密孔菌对不同木材具备不同的白色腐朽能力。Pointing等^[31]通过12周的木材腐朽实验表明,血红密孔菌能分别造成山毛榉 *Fagus sylvatica* 和樟子松 *Pinus sylvestris* 34.9%和19.1%的质量损失。本研究也同样发现血红密孔菌对不同木材表现出较强的选择性侵染腐朽能力,其中对橡木的侵染能力最强,造成质量损失率达到41.37%,而对柚木的侵染能力较弱,只造成2.20%的质量损失。

裂褶菌作为一种白腐真菌,具备降解木材细胞壁中木质纤维素的能力^[32]。Asgher等^[33]研究发现, *S. commune* IBL-06具备木质素降解所需的漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶,其中锰过氧化物酶活性最高,其次是漆酶。本研究中,锰过氧化物酶、漆酶和木质素过氧化物酶在裂褶菌体内表现出相似的活性。然而,通过基因组测序发现,裂褶菌虽然具有丰富的纤维素酶基因和漆酶编码基因,但不存在锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶编码基因,木质素的降解可能主要依靠漆酶或纤维二糖脱氢酶的作用^[34]。虽然裂褶菌具有降解木质纤维素相关的酶,但其活性普遍不高,相应地,其对木材的侵染腐朽能力也不强,造成木材质量损失率为0.61%~2.50%。

层生镰刀菌因能在玉米中分泌伏马菌素而成名^[35],但对木材腐烂能力的研究则较少。本研究中,层生镰刀菌虽然具备较高活性的木质纤维素酶活性,但其对不同木材的侵染能力普遍较弱,造成木材质量损失率<2.00%。尖孢镰刀菌虽然是一种传统的植物病原物,但其体内具有木质素降解的相关酶^[36]。本研究也表明,尖孢镰刀菌菌丝体具有漆酶和锰过氧化物酶的活性,但不存在纤维素酶活性,其对木材的侵染腐朽能力也不强。

通常认为,木质纤维素酶活性高的菌株,相应的降解木质素和纤维素的能力也较强。但从本研究木腐真菌的木质纤维素酶活力及其木材腐朽能力的研究中可以发现,木腐真菌表现出的酶活性和对木材的降解能力不能完全对应,较高的木质纤维素酶活力并不代表其具有较强的木材腐朽能力,如层生镰刀菌;较低的木质纤维素酶活力也不意味着其木材腐朽能力较弱,如毛栓孔菌。可以看出,真菌木质纤维素酶的活性和其木材腐朽能力关系复杂,真菌对木材的腐朽是个复杂的过程,不能仅凭借某些酶的活性而断言其腐朽能力。

4 结论

木腐真菌既是自然界中木质纤维素的主要分解者,也是影响木材使用寿命的主要因素。本研究通过对木腐真菌鉴定及其体内木质纤维素酶系研究,分析其对6种木材的侵染能力,得出如下结论:①利用真菌形态学以及分子生物学方法鉴定出5种木腐真菌,分别为尖孢镰刀菌、毛栓孔菌、层生镰刀菌、裂褶菌和血红密孔菌。②5种木腐真菌体内表现出不同的木质纤维素酶种类和活性,其中层生镰刀菌、毛栓孔菌、裂褶菌和血红密孔菌具备1种或多种木质素酶和纤维素酶,而尖孢镰刀菌仅能分泌木质素酶。③毛栓孔菌对木材的侵染能力最强,其造成不同木材的质量损失率均在20.00%以上(除菠萝格2.21%外),血红密孔菌对不同木材的侵染能力有所差异,其中能造成较高的41.37%橡木质量损失率,也能造成较低的2.20%柚木质量损失率,其余3种真菌对不同木材的侵染能力均不强,造成的质量损失率菌都低于3.00%。④木腐真菌木质纤维素酶与其木材侵染能力不存在正相关,即具有较高或较为丰富木质纤维素酶的木腐真菌不能认定其具有较强的木材侵染能力,反之亦然。

5 参考文献

- [1] 戴玉成,徐梅卿,杨忠,等.中国储木及建筑木材腐朽菌[J].林业科学研究,2008,21(1):49-54.
DAI Yucheng, XU Meiqing, YANG Zhong, et al. Wood-decaying fungi on timber or wooden constructions in China [J]. *For Res*, 21(1): 49-54.
- [2] 戴玉成.中国多孔菌名录[J].菌物学报,2009,28(3):315-327.
DAI Yucheng. A checklist of polypores in China [J]. *Mycosystema*, 2009, 28(3): 315-327.
- [3] DAI Yucheng. A revised checklist of corticioid and hydroid fungi in China for 2010 [J]. *Mycoscience*, 2011, 52(1): 69-79.
- [4] DAI Yucheng. Polypore diversity in China with an annotated checklist of Chinese polypores [J]. *Mycoscience*, 2012,

53(1): 49 – 80.

- [5] 魏玉莲, 戴玉成. 木材腐朽菌在森林生态系统中的功能[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1935 – 1938.
WEI Yulian, DAI Yucheng. Ecological function of wood-inhabiting fungi in forest ecosystem [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2004, 15(10): 1935 – 1938 .
- [6] 戴玉成. 中国储木及建筑木材腐朽菌图志[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 1 – 214.
- [7] MARTINEZ D, LARRONDO L F, PUTNAM N, *et al.* Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78 [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(6): 695 – 700.
- [8] GOLD M H, ALIC M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Microbiol Rev*, 1993, 57(3): 605 – 622.
- [9] PAICE M G, REID I D, BOURBONNAIS R, *et al.* Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(1): 260 – 265.
- [10] PAZARLIOGLU N K, SARIISIK M, TELEFONCU A. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing [J]. *Proc Biochem*, 2005, 40(5): 1673 – 1678.
- [11] MACHUCA A, FERRAZ A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 2001, 29(6/7): 386 – 391.
- [12] FERRAZ A, CORDOVA A M, MACHUCA A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis* [J]. *Enzyme & Microbial Technol*, 2003, 32(1): 59 – 65.
- [13] 燕红, 苏俊, 于彩莲, 等. 高效木质素降解菌株的分离筛选[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2011, 37(3): 259 – 262.
YAN Hong, SU Jun, YU Cailian, *et al.* Isolation and screening of fungal strains with high ligninolytic enzyme activities [J]. *J Zhejiang Univ Agric & Life Sci*, 2011, 37(3): 259 – 262.
- [14] HEINFLING A, MARTÍNEZ M J, MARTÍNEZ A T, *et al.* Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(8): 2788 – 2793.
- [15] ZHOU Jin, WANG Yonghong, CHU Ju, *et al.* Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14 [J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99(15): 6826 – 6833.
- [16] GAO Le, WANG Fenghui, GAO Feng, *et al.* Purification and characterization of a novel cellobiohydrolase (PdCel6A) from *Penicillium decumbens* JU-A10 for bioethanol production [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(17): 8339 – 8342.
- [17] JOO A R, JEYA M, LEE K M, *et al.* Production and characterization of β -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum* [J]. *Proc Biochem*, 2010, 45(6): 851 – 858.
- [18] OHARA T, TSUGE T. *FoSTUA*, encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2004, 13(10): 1412 – 1422.
- [19] 曾祥谓, 崔宝凯, 徐梅卿, 等. 中国储木及建筑木材腐朽菌[J]. 林业科学研究, 2008, 21(6): 783 – 791.
ZENG Xiangwei, CUI Baokai, XU Meiqing, *et al.* Wood-decaying fungi on timber or wooden constructions in China [J]. *For Res*, 2008, 21(6): 783 – 791.
- [20] CHENG Zhongshan, TANG Wencheng, SU Zhijian, *et al.* Identification of mangrove endophytic fungus 1403 (*Fusarium proliferatum*) based on morphological and molecular evidence [J]. *J For Res*, 2008, 19(3): 219 – 224.
- [21] ERDMANN S, FREIHORST D, RAUDASKOSKI M, *et al.* Transcriptome and functional analysis of mating in the basidiomycete *Schizophyllum commune* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2012, 11(5): 571 – 589.
- [22] BACON C W, NELSON P E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* [J]. *J Food Prot*, 1994, 57(6): 514 – 521.
- [23] 晁龙军, 曾大鹏, 孙福在, 等. 引起杨树湿心材的一种病原真菌——*Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg [J]. 林业科学, 1998, 34(5): 69 – 73.
CHAO Longjun, ZENG Dapeng, SUN Fuzai, *et al.* *Fusarium proliferatum*(Matsushima) Nirenberg: a pathogen causing wetwood in poplar trees [J]. *Sci Silv Sin*, 1998, 34(5): 69 – 73.

- [24] REGALADO V, RODRÍGUEZ A, PERESTELO F, *et al.* Lignin degradation and modification by the soil-inhabiting fungus *Fusarium proliferatum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(9): 3716 – 3718.
- [25] 刘波, 黄俊生, 肖荣凤. 尖孢镰刀菌生物学及其生物防治[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 1 – 109.
- [26] VARES T, HATAKKA A. Lignin-degrading activity and ligninolytic enzymes of different white-rot fungi: effects of manganese and malonate [J]. *Can J Bot*, 1997, **75**(1): 61 – 71.
- [27] RANA S, TIWARI R, ARORA A, *et al.* Prospecting *Parthenium* sp. pretreated with *Trametes hirsuta*, as a potential bioethanol feedstock [J]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2013, **2**(2): 152 – 158.
- [28] POINTING S B, JONES E B G, VRIJMOED L L P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture [J]. *Mycologia*, 2000, **92**(1): 139 – 144.
- [29] LU Lei, ZHAO Min, ZHANG Beibei, *et al.* Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **74**(6): 1232 – 1239.
- [30] LU Chunxia, WANG Haiyun, LUO Yuanming, *et al.* An efficient system for pre-delignification of gramineous biofuel feedstock *in vitro*: application of a laccase from *Pycnoporus sanguineus* H275 [J]. *Proc Biochem*, 2010, **45**(7): 1141 – 1147.
- [31] POINTING S B, PARUNGAO M M, HYDE K D. Production of wood-decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical Xylariaceae [J]. *Mycol Res*, 2003, **107**(2): 231 – 235.
- [32] SCHMIDT O, LIESE W. Variability of wood degrading enzymes of *Schizophyllum commune* [J]. *Holzforschung*, 1980, **34**(2): 67 – 72.
- [33] ASGHER M, KAUSAR S, BHATTI H N, *et al.* Optimization of medium for decolorization of solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06 [J]. *Int Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, **61**(2): 189 – 193.
- [34] OHM R A, JONG J F, LUGONES L G, *et al.* Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune* [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, **28**(9): 957 – 963.
- [35] ROSS P F, NELSON P E, RICHARD J L, *et al.* Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(10): 3225 – 3226.
- [36] MÖNKEMANN H, HÖLKER U, HÖLKER M. Components of the ligninolytic system of *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma atroviride* [J]. *Fuel Proc Technol*, 1997, **52**(1/3): 73 – 77.