

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (12) :1507 – 1514; 4 December 2014
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.12.0014

草菇培养料二次发酵过程中真菌的群落结构

陈长卿^{1, 2}, 李桐¹, 姜云⁴, 李玉^{2, 3*}

吉林农业大学,¹ 农学院,² 教育部食药菌工程研究中心,³ 农业部北方食用菌资源利用重点实验室,⁴ 生命科学学院,
吉林 长春 130118

摘要: 【目的】明确草菇培养料二次发酵过程中真菌群落变化情况, 确定发酵不同阶段的优势菌群, 为能够在分子水平上准确高效监测发酵过程, 解析发酵机制奠定基础。【方法】采用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 及克隆菌株 18S rDNA 序列分析技术对草菇培养料二次发酵不同阶段真菌群落结构进行分析。【结果】DGGE 图谱显示, 不同处理真菌群落多样性存在差异, 发酵高温阶段条带多样性较高, 而且优势条带及相对含量也在发生动态变化。回收克隆不同发酵阶段的 20 个优势菌株中, 9 个菌株为非培养未知真核生物或真菌, 其余克隆菌株为非培养散子囊菌目 (Eurotiales)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、曲霉菌属 (*Aspergillus* sp.)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、*Melanocarpus albomyces*、炭疽菌属 (*Colletotrichum* sp.)、根毛霉菌属 (*Rhizomucor* sp.)、轮枝菌属 (*Verticillium* sp.)、普通青霉 (*Penicillium commune*)、三角孢小囊菌 (*Microascus trigonosporus*) 和 *Trichosporon lactis* 真菌, 其中 14 株 (70%) 克隆菌株为耐热真菌。【结论】草菇培养料二次发酵过程中真菌群落结构及优势菌群在发生着动态的变化。

关键词: 草菇, 二次发酵, 真菌群落, 18S rDNA-变性梯度凝胶电泳

中图分类号: Q938.1 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 12-1507-08

草菇 [*Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr.) Sing.] 在国际市场上享有“中国蘑菇”的声誉, 是一种高温型草腐菌, 兼有营养和保健价值, 经济效益较高, 是具有良好发展前景的食用菌之一。目前中国是草菇最大的生产国和出口国, 产量占到世界总产量的 80% 以上。在草菇生产过程中, 培养基的种类和处理方法是决定栽培效果的关键环节。相比生料栽培法和自然堆沤发酵法, 二次发酵法 (也称后发酵), 具有缩短生产时间、降低成本、提高产量和品质、减少病虫害发生等优点, 是目前草菇栽培上最为普遍应用的一种方法, 也已成为现代草菇工厂化生产的

核心技术^[1]。二次发酵是以微生物作用为主导的物理化学和生物学过程, 是由群落结构演替迅速的多种微生物群落共同作用而实现的动态过程, 各个微生物群落在一定的时间内有适合自身生长繁殖的条件, 对某一类特定物质起分解作用, 使培养料转化为有利于食用菌菌丝生长的“选择性”栽培基质, 提高营养转化效率, 各种微生物的生理代谢和群落衍替决定了培养料的二次发酵质量。因此, 明确发酵过程中优势微生物种类及其演替规律极为重要。然而, 关于食用菌培养料发酵过程中微生物动态变化的研究报道较少, 其主要集中在对双孢蘑菇

基金项目: 国家现代农业 (食用菌) 产业技术体系; 中国博士后科学基金面上项目 (2013M530996); 吉林农业大学博士后基金

* 通信作者。Tel: +86-431-84532989; E-mail: yuli966@126.com

作者简介: 陈长卿 (1978 -), 黑龙江伊春人, 博士, 副教授, 主要从事微生物群落结构研究。E-mail: ccqjy@163.com

收稿日期: 2014-03-21; **修回日期:** 2014-05-12

(*Agarius bisporus*) 的相关研究。Yang 等^[1] (2002) 和周秋香等^[2] (2003) 分别采用纯培养结合 TGGE 方法对双孢蘑菇培养料二次发酵真菌多样性进行了分析。何丽鸿等^[3] 和 Székely 等^[4] 在 2009 年曾分别报道了运用 DGGE 技术对双孢蘑菇主要以麦草和鸡粪为培养料进行二次发酵过程中的细菌群落结构变化。但相比双孢蘑菇而言,草菇培养料与之不同,二次发酵处理时间也相对较短,发酵进程也存在较大差异,这些不同都会对发酵料中的微生物群落结构组成及演替变化规律产生重要影响。针对草菇相关方面研究的空白,本课题组于 2012 年首先对草菇培养料二次发酵中细菌群落结构变化进行了分析,明确了优势细菌类群的种类及其在发酵过程中的变化情况。本研究是运用 DGGE 及克隆菌株 18S rDNA 序列分析技术对二次发酵过程中另一类重要微生物——真菌群落进行分子生态学研究,期望明确发酵不同阶段微生物群落的组成及其演替变化情况,为解析发酵机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 实验材料来源及处理同此前细菌群落结构研究^[5],在草菇培养料二次发酵不同阶段采用多次混合采集样品,样品分为 5 个处理,分别为 A(料温 25.5℃, 0 h), B(料温 32.4 – 50.3℃, 7 h), C(料温 56.7℃, 9 h), D(料温 52.0 – 40.0℃, 16 h), E(料温 32.6℃, 18 h)。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 所需试剂、Goldview 染液和基因克隆所用 pMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司,引物和胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司。其他试剂均为国产分析纯试剂。仪器包括 5810R 台式冷冻离心机 (Eppendorf, 德国), PTC-240 PCR 扩增仪 (Bio-Rad, 美国), Dcode™ 基因突变检测系统 (Bio-Rad, 美国), SW-CJ-4D 洁净工作台 (江苏苏洁净化设备厂), 凝胶成像系统 (UVI, 英国)。

1.2 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

参考陈长卿等^[6] 方法,利用磷酸缓冲液将样品进行预处理,而后提取基因组 DNA。利用真菌 18S rDNA 特异性引物 FUNG (5'-ATCCCCGTTACCCGTTG-3') 和 NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')

进行 PCR 扩增,上游引物 5'端连接 GC 夹板 (CGCCC GCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCCGCCCC)。反应体系: 10 × Buffer (含 2.0 mmol/L MgCl₂) 5.0 μL, dNTP (10 mmol/L) 1.0 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1.0 μL, Taq 酶 1.25U, 模板 DNA (50ng/μL) 1.0 μL, ddH₂O 补充至 50 μL, 设置阴性对照。反应程序: 94℃ 4 min; 94℃ 0.5 min, 56℃ 1.0 min, 72℃ 0.5 min, 30 个循环; 72℃ 7.0 min。取各处理的 PCR 产物 3.0 μL, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上, 5% Goldview 染液, 1 × TAE 缓冲液, 120 V 稳压电泳 40 min, 凝胶成像系统进行检测。

1.3 DGGE 电泳及图谱分析

参照陈长卿等方法^[5], 采用 Dcode™ 基因突变检测系统对 PCR 产物进行 DGGE 电泳分离。使用 Quantity One 2.0 软件 (Bio-Rad, USA) 对 DGGE 图谱进行自动分析, 确定样品电泳条带的多少和相对含量。

1.4 DGGE 条带回收和序列系统发育分析

参照陈长卿等方法^[5], 对各处理中优势条带 (编号如图 1) 进行割胶、产物回收、克隆、测序, 交由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将测序结果提交到 GenBank 中进行 Blast 分析比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 并采用 MEGA4.0^[7] 软件中的 Neighbor-Joining (NJ) 方法进行 2000 次 Bootstrap 检验后构建系统发育树, 确定菌株的种类。

2 结果和分析

2.1 DGGE 图谱分析

不同处理样品中的真菌类群 18Sr DNA V3 区域的 PCR 片段大小一致, 利用 35% -60% 的变性梯度电泳将不同真菌类群进行了较好的分离, DGGE 图谱经过 Quantity One 2.0 软件处理后得出条带数量、位置和相对丰度值 (图 1, 表 1)。结果显示, 电泳图谱共获得 146 个条带, 各处理中的条带数量和相对丰度值存在差异, 处理 A 至 E 的 5 组中分别获得 29、25、31、33 和 28 个条带。

选择 20 个优势条带进行了测序和相对含量分析, 其中 1、2、3、7、9、10、11、13 和 20 号条带贯穿 5 个处理, 占优势条带数量的 45%, 其余条带在各处理中的分布不同, 4、5、8 和 16 号条带只是在处理 A

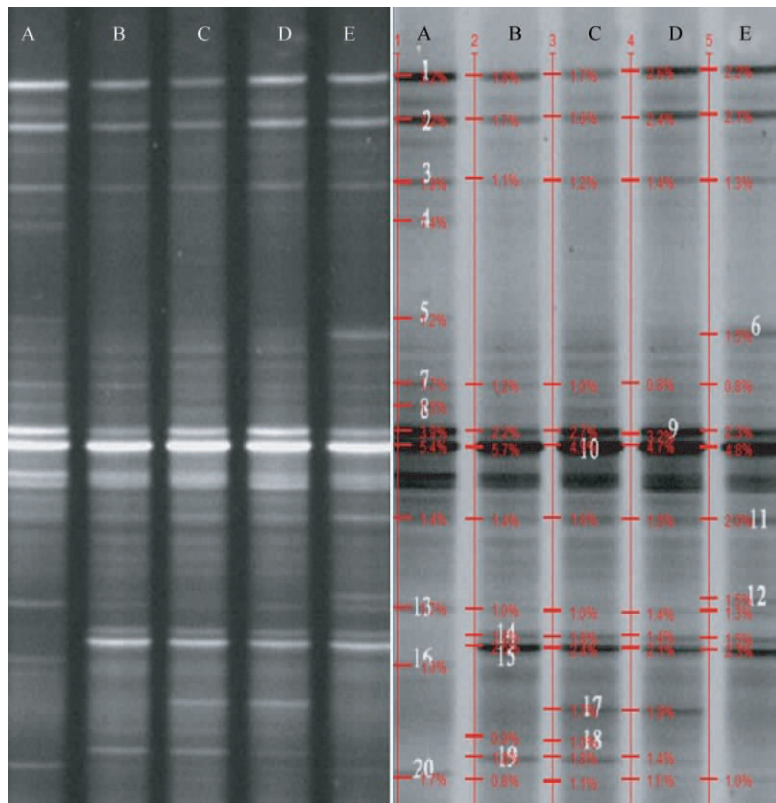


图 1. 草菇培养料二次发酵中真菌 18S rDNA DGGE 分析图谱

Figure 1. DGGE profiles of amplified 18S rDNA fragments from Phase II compost of *Volvariella volvacea*.

"A-E" were five different treatments in the test. The 20 numbers represent the bands of predominant clone strains used for sequence analysis.

中出现,即二次发酵前阶段;随着二次发酵的进行丰度逐渐减弱或消失,6号和12号条带只在处理E中出现,即二次发酵后阶段;14号和15号条带则是从二次发酵开始(处理B)到结束后(处理E)的各处理中均能被检测到的;而17、18和19号条带是仅能在二次发酵过程中被检测的。图谱分析结果显示,条带在各处理间的相对含量值都发生了不同程度的变化。有些条带的相对含量是随着二次发酵的进行呈现先降后升再降的趋势,例如1、2、3、9、和13号条带;而7号条带则呈现下降趋势;11号条带与之相反,呈现持续上升趋势。

2.2 目的条带序列测定及聚类分析

将20个优势条带进行回收、克隆并测序,序列提交到GenBank中进行了Blast比对分析,构建系统进化树。结果显示(表2,图2),所有序列比对同源性均高于97%,有9条序列为非培养真核生物和真菌的18S rDNA片段,其中8号和16号条带克隆菌株为未知真核生物,1、5、10、11、12和19号条带克隆菌株为未知真菌,13号条带克隆菌株为未知子囊

表 1. 不同处理样品中 DGGE 条带的相对含量 (%)

Table 1. The relative quantity of DGGE bands within the different composting samples

Band number	Treatments				
	A	B	C	D	E
1	3.2	1.8	1.7	2.6	2.2
2	3.2	1.7	1.6	2.4	2.1
3	1.9	1.1	1.2	1.4	1.3
4	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0
5	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5
7	1.7	1.2	1.0	0.8	0.8
8	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0
9	3.9	2.2	2.7	3.2	2.3
10	5.4	5.7	4.9	4.7	4.8
11	1.4	1.4	1.6	1.6	2.0
12	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5
13	1.7	1.0	1.0	1.4	1.3
14	0.0	1.8	1.8	1.4	1.5
15	0.0	2.6	2.4	2.1	2.3
16	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
17	0.0	0.0	1.7	1.9	0.0
18	0.0	0.9	1.0	0.0	0.0
19	0.0	1.8	1.8	1.4	0.0
20	1.7	0.8	1.1	1.1	1.0

菌 (ascomycete)。其余 11 个条带克隆菌株中,17 号为非培养散子囊菌目 (Eurotiales) 真菌,3 个菌株为曲霉属真菌 (*Aspergillus*), 分别为烟曲霉 (*A. fumigatus*, 3 号)、曲霉菌属 (*A. sp.*, 7 号) 和米曲霉 (*A. oryzae*, 20 号), 其它 7 株菌分别属于 *Melanocarpus albomyces* (2 号)、炭疽菌属 (*Colletotrichum sp.*, 4 号)、轮枝菌属 (*Verticillium*

sp., 6 号)、根毛霉菌属 (*Rhizomucor sp.*, 9 号)、普通青霉 (*Penicillium commune*, 14 号)、三角孢小囊菌 (*Microascus trigonosporus*, 15 号) 和 *Trichosporon lactis* (18 号) 真菌。研究结果还显示,除 4 号、5 号、6 号、8 号、12 号和 16 号克隆菌株外,获得的其余 14 (70%) 株克隆菌株均为耐热真菌 (在 C 代表的发酵料高温期和持温期出现的菌株)。

表 2. DGGE 条带序列系统发育种类分析

Table 2. Phylogenetic affiliation of sequences retrieved from DGGE bands

Band No.	Most closely related organism (GenBank accession No.)	Similarity /%	Affiliation
1	Uncultured fungus clone SIP (HM475196)	98.85	Uncultured fungus
2	<i>Melanocarpus albomyces</i> (JQ067911)	99.71	Uncultured <i>Melanocarpus albomyces</i>
3	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain FS160 (FJ840490)	99.71	Uncultured <i>Aspergillus fumigatus</i>
4	<i>Colletotrichum sp.</i> (EU375524)	99.71	Uncultured <i>Colletotrichum sp.</i>
5	Uncultured fungus clone nco39g08c1 (KC670775)	99.71	Uncultured fungus
6	Uncultured <i>Verticillium</i> isolate DGGE gel band BJTL7 (JX215303)	99.71	Uncultured <i>Verticillium sp.</i>
7	Uncultured <i>Aspergillus</i> clone S-10 (FJ393420)	98.56	Uncultured <i>Aspergillus sp.</i>
8	Uncultured eukaryote clone P3S4-1_a01 (KF356755)	97.12	Uncultured eukaryote
9	Uncultured <i>Rhizomucor</i> isolate DGGE gel band R1 (KF258898)	100.00	Uncultured <i>Rhizomucor sp.</i>
10	Uncultured fungus clone SIP_Fungi_M2_07 (HM475191)	99.71	Uncultured fungus
11	Uncultured fungus (FJ236962)	99.71	Uncultured fungus
12	Uncultured fungus isolate DGGE gel band 11 (JN591708)	100.00	Uncultured fungus
13	Uncultured ascomycete clone UF-81 (AY496502)	99.71	Uncultured ascomycete
14	<i>Penicillium commune</i> (KF018446)	99.71	Uncultured <i>Penicillium commune</i>
15	<i>Microascus trigonosporus</i> (DQ471006)	99.42	Uncultured <i>Microascus trigonosporus</i>
16	Uncultured eukaryote clone (HQ999659)	99.71	Uncultured eukaryote
17	Uncultured Eurotiales clone BFC103 (GU305975)	99.71	Uncultured Eurotiales
18	<i>Trichosporon lactis</i> (AJ319755)	100.00	Uncultured <i>Trichosporon lactis</i>
19	Uncultured fungus clone F42 (JQ581576)	99.43	Uncultured fungus
20	<i>Aspergillus oryzae</i> (HM536621)	100.00	Uncultured <i>Aspergillus oryzae</i>

3 讨论

1978 年张树庭教授将二次发酵技术引入中国以来,通过不断完善,废棉二次发酵处理法已成为目前生产上草菇栽培的核心技术。二次发酵过程一般包括 3 个阶段,即升温期、持温期和降温期,即本实验中所设置的 B、C、D 处理。升温期阶段,常温开始加温至 50 - 60℃;持温期又称控温发酵期,是后发酵主要阶段,为嗜热微生物创造了适宜的生长环境,同时也抑制了病虫害的发生;降温期阶段,温度下降,嗜温微生物又占优势,对残余较难分解的有机物做进一步分解^[8]。培养料处理质量以及草菇的产量与发酵过程中不同阶段微生物群落所发挥的重要作用密切相关。然而,包括培养料在内的环境

微生物,能够人工培养的种类仅为 0.1%,绝大多数是不可培养的未知微生物^[9]。因此采用非培养分子生物学方法可以了解发酵过程中整个微生物群落的变化趋势,确定优势类群的种类,避免未知微生物的疏漏,提高了结果的准确性。本研究首次对草菇培养料二次发酵过程中的真菌群落变化开展研究,发现不同发酵阶段真菌群落结构在种类和丰度上存在着一定的差异,随着二次发酵过程的进行,真菌群落在发生着动态的演替。根据 18S rDNA 序列初步确定了优势菌群的分类地位,并发现了一些未知真菌,也在高温期和持温期检测到多种耐热真菌。

相比食用菌培养料发酵中细菌群落变化相关报道,关于真菌群落的研究较少。刘灿等^[10] (2010) 和王鸿磊等^[11] (2011),采用传统培养方法对双孢菇培养料工厂化发酵过程中微生物及物质变化进行了研

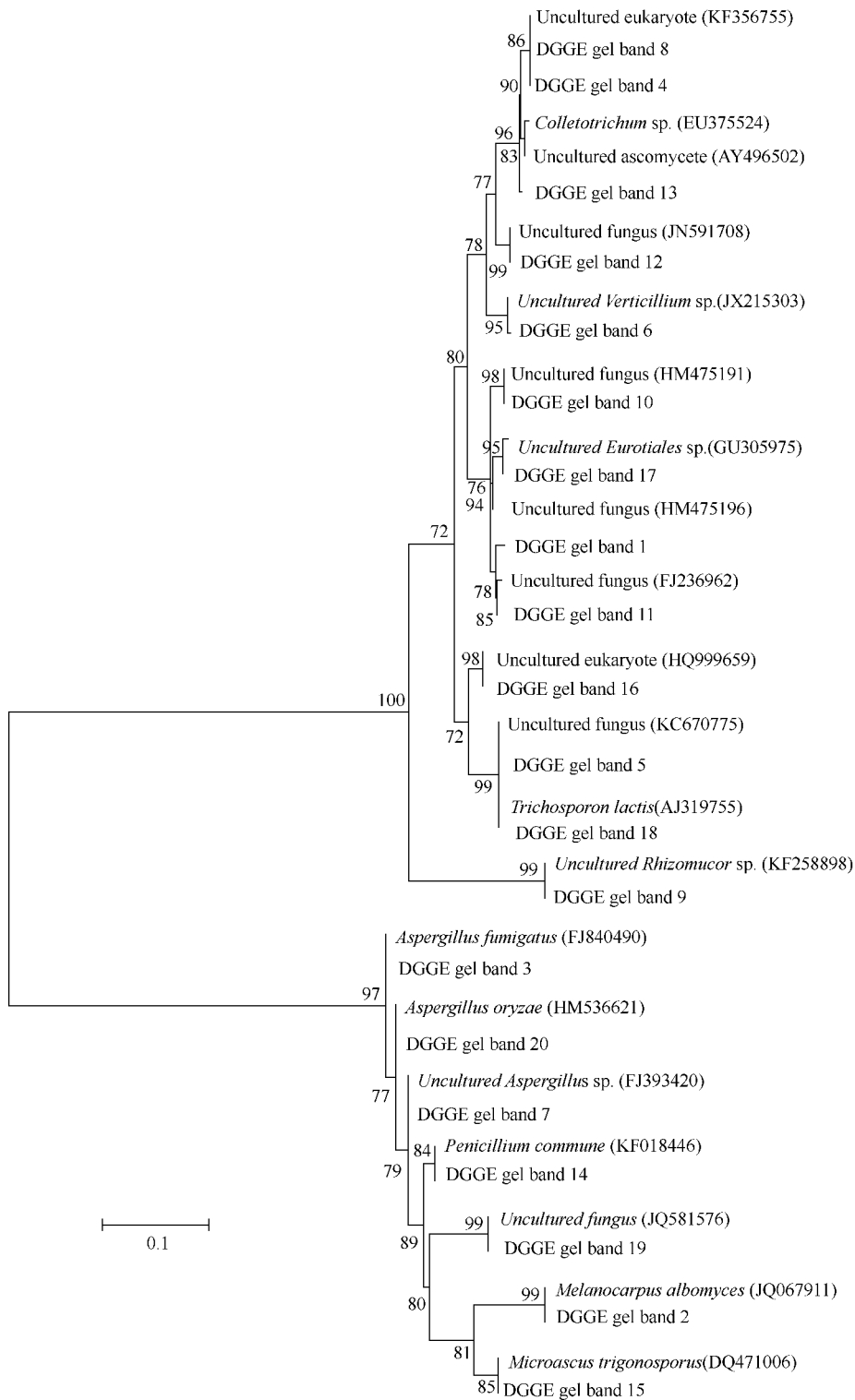


图 2. DGGE 优势条带克隆菌株的 18S rRNA 序列系统发育分析

Figure 2. Phylogenetic analysis of the predominant bands in the DGGE profile based on partial 18S rRNA sequence. Numbers in parentheses represent the GenBank accession number of sequences. The number at each branch points is bootstrap values evaluated in 2000 replicates. Bar with 0.1 sequence divergence.

究,结果均表明,随着培养料发酵的进行,细菌、放线菌和霉菌3大类微生物的数量均表现为先下降后上升的趋势,其中细菌和放线菌占优。而在本研究中,通过 DGGE 图谱发现二次发酵过程中真菌群落多样性丰富,电泳条带数量先减少后增加再减少,在持温期和降温期最高,呈现出了真菌群落多样性的变化趋势,这一发现与此前相同实验处理中细菌群落多样性逐渐下降的结果不同^[5]。对于各优势菌群,其相对含量变化趋势是存在差异的,表明真菌群落在种类和相对含量上均发生着动态演替变化(表1),例如,从发酵前(处理A)到发酵升温期阶段(处理B),3、7、8、13和20号菌群条带由优势条带演替为非优势条带;14、15和19号菌群则在发酵阶段首次出现,并成为升温期到降温期(处理D)的优势菌群;17号菌群则在持温期(处理C)和降温期才出现,并成为优势菌群;而有些只在发酵前阶段和发酵结束后阶段(处理E)被检测到的菌群,可能并未在发酵过程中发挥作用或者含量极低。

在发酵过程中尤其是发酵中后期,嗜热真菌的数量和活性与蘑菇产量是密切相关的^[12]。本研究从培养料升温期到降温期检测到一些嗜热真菌类群,包括 *Aspergillus fumigatus*、*A. oryzae*、*A. sp.*、*Melanocarpus albomyces*、*Rhizomucor sp.*、*Penicillium commune*、*Microascus trigonosporus* 和 *Trichosporon lactis* 真菌,以及6株未知属的真菌或真核生物。其中 *A. fumigatus*、*Rhizomucor sp.* 和 *Melanocarpus albomyces* 在此前的蘑菇培养料发酵过程中已有发现和报道。Wickremasinghe 等^[13] (1999) 通过对草菇培养料真菌群落进行分离和鉴定后发现了 *Chetomium thermophile*、*Mucor pusillus*、*Aspergillus fumigatus* 和 *Trichoderma harzianum* 4种真菌,并以后两种为优势菌群。Salar 和 Aneja^[14] (2007) 在双孢菇培养料中分离获得了18种嗜热真菌,主要为 *Chaetomium thermophile*、*Malbranchea sulfurea*、*Thermomyces lanuginosus* 和 *Torula thermophila*。还包括 *A. fumigatus* 和 *Rhizomucor spp.* 等真菌。Tuomela 等^[15] (2000) 报道了蘑菇培养料中嗜热真菌 *M. albomyces* 的存在。而本研究中发现的其它种类的嗜热真菌在蘑菇培养料发酵过程中未见有报道,但在发酵和堆肥中有相关研究,如曲霉属和青霉属真菌。Patil 等^[16] (1979) 通过试验发现 *A. flavipes*、*Penicillium chrysogenum*、*Chochiobolus spicefer*、

Rhizopus oryzae 和 *Trichoderma viride* 可通过堆肥方式有效地降解垃圾。Gaur 等^[17] (1982) 研究发现人工接种 *A. niger* 和 *Penicillium sp.* 可以减少堆肥时间并提高氮、磷和腐殖质含量,提升堆肥质量。Shinde 和 Rote^[18] (1983) 报道磷酸盐和 *A. sp.*、*Penicillium sp.* 和 *Trichurus spirulis* 微生物组合在甘蔗渣堆肥过程中,可显著地加速堆料的分解速度,仅用了3~4个月,相比不做任何处理的对照甚至缩短了5个月的时间。此外,Ryckeboer 等^[19] (2003) 对不同基质堆肥中存在的真菌和细菌种类进行了统计,其中包括有 *Penicillium commune*、*Microascus* 属真菌 *M. cirrosus* 和 *Trichosporon* 属真菌 *T. sporotrichoides*。而本研究中发现的 *Microascus trigonosporus* 和 *Trichosporon lactis* 在此前的相关研究中未见报道。Wiegant 等^[20] (1992) 和 Straatsma 等^[21] (1993) 报道了在双孢菇培养料中对嗜热真菌 *Scytilidium thermophilum* 的分离、生长特性以及对蘑菇生长的促生机制研究,但在本研究中并未检测到该真菌,这可能与发酵培养料成分、生态环境和发酵处理方式不同等因素相关。

参考文献

- [1] Yang H, Hang XM, Li DT. Analysis of fungi in mushroom compost using PCR and TGGE of ribosomal DNA. *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 2002, E-7 (1): 119-122.
- [2] Zhou Q, Yang L. Study on the fungal diversity in mushroom compost. *Journal of Hebei University*, 2003, 23 (3): 302-306. (in Chinese)
周秋香, 杨莉丽. 蘑菇基肥中真菌多样性的研究. 河北大学学报, 2003, 23 (3): 302-306.
- [3] He L, Chen M, Pan Y. Bacterial communities in the phase II of *Agaricus bisporus* compost by denaturing gradient gel electrophoresis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49 (2): 227-232. (in Chinese)
何丽鸿, 陈明杰, 潘迎捷. 采用变性梯度凝胶电泳研究双孢蘑菇培养料后发酵过程中的细菌群落结构. 微生物学报, 2009, 49 (2): 227-232.
- [4] Székely AJ, Sipos R, Berta B, Vajna B, Hajdú C, Máriaiget K. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. *Microbial Ecology*, 2009, 57 (3): 522-533.
- [5] Chen C, Jiang Y, Meng L, Li Y. Denaturing gradient gel

- electrophoresis analysis on bacterial community change in the phase II composting of *Volvariella volvacea* substrate. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (8) : 977-984. (in Chinese)
- 陈长卿, 姜云, 孟丽, 李玉. 变性梯度凝胶电泳分析草菇培养料二次发酵过程中细菌群落演替. *微生物学报*, 2012, 52 (8) : 977-984.
- [6] Chen C, Kang Z, Wang X, Huang L, Zuo Y. Molecular detection of *Phytophthora sojae*. *Journal of Northwest A&F University*, 2005, 33 (8) : 73-77. (in Chinese)
- 陈长卿, 康振生, 王晓杰, 黄丽丽, 左豫虎. 大豆疫霉的分子检测. *西北农林科技大学学报*, 2005, 33 (8) : 73-77.
- [7] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8) : 1596-1599.
- [8] Lu Z. The change and Latest development in compost technology of *Volvariella volvacea* substrate. *Edible Fungi of China*, 2009, 28 (1) : 3-5. (in Chinese)
- 卢政辉. 双孢蘑菇培养料堆制技术的变革和最新进展. *中国食用菌*, 2009, 28 (1) : 3-5.
- [9] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59 (1) : 143-169.
- [10] Liu C, Sheng J, Zou J, Wang H, Ding Q, Shen L. Effects of microbial changes on physical and chemical characteristics of *Agaricus bisporus* compost during fermentation. *Food Science*, 2010, 31 (13) : 240-243. (in Chinese)
- 刘灿, 生吉萍, 邹积华, 王鸿磊, 丁强, 申琳. 双孢菇培养基堆制产热过程中微生物变化对其理化性质的影响. *食品科学*, 2010, 31 (13) : 240-243.
- [11] Wang H, Wang H, Song J, Ding Q, Xu K, Zou J. Variation of microorganisms and physicochemical properties of *Agaricus bisporus* compost. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39 (1) : 94-96. (in Chinese)
- 王鸿磊, 王红艳, 宋俊芬, 丁强, 徐康铭, 邹积华. 双孢菇培养料工厂化发酵过程中微生物及物质变化研究. *安徽农业科学*, 2011, 39 (1) : 94-96.
- [12] Ye J. The yield effects of thermophilic fungi in secondary fermentation of mushroom. *Edible Fungi of China*, 1996, 15 (4) : 25. (in Chinese)
- 叶建文. 蘑菇后发酵中嗜热真菌对产量的影响. *中国食用菌*, 1996, 15 (4) : 25.
- [13] Wickremasinghe R, Abeywickrama K, Abeytunga DTU. Isolation and identification of fungi from mushroom composts and evaluation of their biological activity. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 1999, 27 (1) : 29-40.
- [14] Salar RK, Aneja KR. Significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation: effect on growth and yield of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Journal of Agricultural Technology*, 2007, 3 (2) : 241-253.
- [15] Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, Itävaara M. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Bioresource Technology*, 2000, 72 (2) : 169-183.
- [16] Patil PH, Bachhau MB, Hapase DG. Microbial decomposition of sugarcane trash. *Indian Journal of Sugarcane Technology*, 1979, 2 (1) : 15-19.
- [17] Gaur SC, Sadasivam KV, Mathur RS, Mager SP. Role of mesophilic fungi in composting. *Agricultural Wastes*, 1982, 4 (6) : 453-460.
- [18] Shinde BN, Rote BP. Use of rock phosphate and microbial culture for the composting of sugarcane trash by heap method. *Indian Journal of Agricultural Chemistry*, 1983, 15 (3) : 147-154.
- [19] Ryckeboer J, Mergaert J, Vaes K, Klammer S, De Clercq D, Coosemans J, Insam H, Swings J. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology*. 2003, 53 (4) : 349-410.
- [20] Wiegant WM. Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production of mushroom compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58 (4) : 1301-1307.
- [21] Straatsma G, Samson RA. Taxonomy of *Scytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost. *Mycological Research*. 1993, 97 (3) : 321-328.

Fungal community structure in phase II composting of *Volvariella volvacea*

Changqing Chen^{1, 2}, Tong Li¹, Yun Jiang⁴, Yu Li^{2, 3*}

¹ College of Agronomy; ² Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi;

³ Key Laboratory of North Edible Fungus Resources and Application, Ministry of Agriculture; ⁴ College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China

Abstract: [Objective] To understand the fungal community succession during the phase II of *Volvariella volvacea* compost and clarify the predominant fungi in different fermentation stages, to monitor the dynamic compost at the molecular level accurately and quickly, and reveal the mechanism. [Methods] The 18S rDNA-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and sequencing methods were used to analyze the fungal community structure during the course of compost. [Results] The DGGE profile shows that there were differences in the diversity of fungal community with the fermentation progress. The diversity was higher in the stages of high temperature. And the dynamic changes of predominant community and relative intensity was observed. Among the 20 predominant clone strains, 9 were unknown eukaryote and fungi, the others were Eurotiales, *Aspergillus* sp., *Melanocarpus albomyces*, *Colletotrichum* sp., *Rhizomucor* sp., *Verticillium* sp., *Penicillium commune*, *Microascus trigonosporus* and *Trichosporon lactis*. The 14 clone strains were detected in the stages of high and durative temperature. [Conclusion] The fungal community structure and predominant community have taken dynamic succession during the phase II of *Volvariella volvacea* compost.

Keywords: *Volvariella volvacea*, phase II of compost, fungal community, 18S rDNA-denaturing gradient gel electrophoresis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Project Funded the Earmarked Fund for National Modern Agro-industry Technology Research System, by the China Postdoctoral Science Foundation (2013M530996) and by the Postdoctoral Fund of Jilin Agricultural University

* Corresponding author. Tel: +86-431-84532989; E-mail: yuli966@126.com

Received: 21 March 2014/ Revised: 12 May 2014