

- [3] Yang X L, Xu H B, Wu J Z, *et al.* Application of nano-technology in the research of traditional Chinese medicine [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol* (华中理工大学学报), 2000, 28(12): 104-105.
- [4] Chen J, Wu Z H. Medication transfer through blood and brain barrier by nanotechnology [J]. *Foreign Med Sci: Pharmacy* (国外医学: 药学分册), 2002, 19(6): 333-336.
- [5] Wei H, Li Y G. Nanotechnology apply on biomedicine engineering-research actuality and development current [J]. *Foreign Med Sci: Sect Biomed Engin* (国外医学: 生物医学工程分册), 1999, 22(6): 340.
- [6] Wang Y, Wu W. Recessive nanograin inner target [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 39(1): 7-11.
- [7] Gref R, Minamitake Y, Peracchia M T, *et al.* Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres [J]. *Science*, 1997, 263(5153): 1600-1603.
- [8] Chang J, Liu H F, Yao K D, *et al.* Nano control center research evolvement apply in medicine [J]. *Chin Biomed Eng* (中国生物医学工程学报), 2002, 19(4): 424.
- [9] Xu H B, Yang X L, Xie C S, *et al.* Nanotechnology apply in Chinese traditional medicine investigation [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学), 2001, 32(3): 161-162.
- [10] Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting [J]. *Adv Enzyme Regul*, 2001, 41: 189.
- [11] Zhang Y, Cheng S L, Gai G S, *et al.* Chinese traditional and heral drugs and dissolve medicine exceed slender comminution technology [J]. *World Sci Technol* (世界科学技术), 2001, 3(2): 9-12.
- [12] Xu J Z. Sprayer desiccation apply on Chinese traditional medicine preparation [J]. *Primary J Chin Mater Med* (基层中药杂志), 1999, 13(3): 55-56.
- [13] Gao M H. Nanograin comminute currency equipment [J]. *Recent Dev Sci Technol Abroad* (国外科技动态), 1997(1): 47.
- [14] Benjamin J S. The mechanical alloying process [J]. *Mod Dev Powder Metal*, 1988, 21: 397-414.
- [15] Xie C S, Hu J H, Wu R, *et al.* Structure transition comparison between the amorphous nanosize particles and coarse-grained polycrystalline of cobalt [J]. *Nanostruct Mater*, 1999, 11(8): 1061-1062.
- [16] Xie C S. Evaluation of allog emement redistribution within laser melted layer [J]. *Surf Coat Technol*, 1999, 113: 1-3.
- [17] Nishioka Y, Yoshino H. Lymphatic targeting with nanoparticulate system [J]. *Adv Drug Del Rev*, 2002, 47: 55-64.
- [18] Schofield J P, Caskey C. Non-viral approaches to gene therapy [J]. *Br Merd Bul*, 1995, 51(1): 56.
- [19] Dange C, Michel C, Aprahanian M, *et al.* New approach for oral administration of insulin with polyalkyanoacrylate nanoparticles as drug carrier [J]. *Diabete*, 1998, 37: 246.
- [20] Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, *et al.* Mucoadhesive DLLactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin [J]. *Pharm Dev Technol*, 2000, 5: 77.
- [21] Damage C, Michel C, Aprahanian M, *et al.* New approach for oral administration of insulin with pnialkyeyanoacry nanoparticles as drug career [J]. *Diabates*, 1988, 37: 246.
- [22] Guo L W. *Chinese Traditional Medicine Dynamics Method and Application* (中药药动力学方法与应用) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.

块菌活性成分及其人工栽培研究进展

汤亚杰, 孔国平, 朱伶俐, 刘瑞桑, 李冬生

(湖北工业大学生物工程学院 工业微生物湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430068)

摘要: 块菌是生长在森林地下的药食两用真菌, 生物分类学上属于子囊菌亚门、块菌目、块菌科、块菌属, 其主要活性成分有 α -雄烷醇、神经酰胺、块菌多糖等。 α -雄烷醇是一种类固醇化合物, 具有调节女性月经周期、引起女性性兴奋的功能; 神经酰胺具有保湿(可以作为皮肤屏障)、诱导细胞凋亡、抗肿瘤、免疫调节等功能; 块菌多糖具有抗肿瘤并参与免疫调节等功能。在半人工模拟栽培中, 块菌易受到其他外生菌根的影响, 从接种到收获, 一般需要 7~9 年的时间。块菌具有可培养性, 利用微生物发酵技术大规模生产块菌中的活性成分具有广阔的应用前景。

关键词: 块菌; α -雄烷醇; 神经酰胺; 多糖; 半人工模拟栽培

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)04-0629-04

Advances in studies on active constituents from truffle and its artificial cultivation

TANG Ya-jie, KONG Guo-ping, ZHU Ling-li, LIU Rui-sang, LI Dong-sheng

(Hubei Provincial Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Bioengineering, Hubei

University of Technology, Wuhan 430068, China)

Key words: truffle; α -androsthenol; ceramide; polysaccharide; semi-artificial simulation cultivation

块菌是世界上最珍贵的药食两用真菌之一, 其子囊果呈球形、半球形或块状, 直径一般在 1.5~12 cm, 成熟后为褐

色、红褐色至深褐色, 基部常凹陷, 表面布以大小不一的小疣。块菌的产地狭窄, 主要分布于欧洲大陆的北温带和寒带

收稿日期: 2006-08-25

基金项目: 人事部留学人员科技活动择优资助优秀项目; 教育部留学回国人员科研启动基金; 湖北省“楚天学者”奖励计划; 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队(T200608); 湖北省自然科学基金青年杰出人才(2006ABB034); 武汉市青年科技晨光计划(20065004116-31); 湖北工业大学科学技术基金重大项目(306.18002)

作者简介: 汤亚杰(1973—), 男, 湖北武穴人, 博士, 教授, 2005年毕业于美国麻省理工学院(MIT), 2006年被聘为湖北省生物工程学科“楚天学者”特聘教授。研究方向为代谢调控药用真菌深层发酵过程高效生产次级代谢产物; 生物转化修饰天然活性先导产物分子结构。 E-mail: yajietang@hotmail.com Tel&Fax: (027)88015108

万方数据

地区,市场上的块菌主要来源于野生和半人工模拟栽培,新鲜黑孢块菌的价格在欧美市场上高达每公斤1千美元,被喻为“地下黄金”和“黑色钻石”。块菌对生长条件要求苛刻,自然界中的块菌是与生长于石灰质等碱性土壤环境中树种(如橡树、栎树)的根系共生,产量有限。块菌在市场上一直供不应求,价值显赫。块菌的生理生态、人工栽培等方面的研究为近年来备受关注的国际性研究课题之一,但块菌中生物活性成分及其生产方法研究较少。本文对块菌活性成分及其人工栽培的研究进展做一综述。

1 块菌生物学

块菌(truffle)是地下生菌物中一个比较重要的子囊菌类群,子实体在土壤中生长,除个别种类在成熟时半露出土表外,大部分种类自始至终埋生于地下,是与树木共生的外生菌根型真菌。块菌在生物学分类上属于子囊菌亚门、块菌目、块菌科、块菌属(*Tuber* F. H. Wigg.)^[1,2]。常见的块菌有黑孢块菌 *T. melanosporum* Vittad、印度块菌 *T. indicum* Cooke、中国块菌 *T. sinense* Tao et Liu 等。我国云南产的印度块菌和四川产的中国块菌在外形上与黑孢块菌相似,其品质亦可与欧洲产的黑孢块菌相媲美^[3]。目前国际市场上每公斤新鲜黑孢块菌的价格高达1千多美元,其昂贵的价格和黑色、疣状的外形被赋予森林中“黑色钻石”的美誉^[4]。

2 块菌主要活性成分

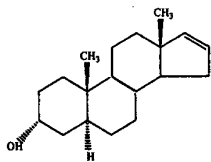


图1 α-雄烷醇的化学结构

Fig. 1 Structure of α-androst-16-en-3α-ol
α-雄烷醇(androstenol, 5α-androst-16-en-3α-ol):是块菌中存在的一种具有生物活性的类固醇化合物,该化合物在化学结构(图1)上类似于人体内的性激素成分,具有成为新型性激素类药物的潜力^[5]。图1α-雄烷醇早在1951年就

从女性的尿液中被检测出来,其香味浓厚,被认为具有一定的催欲作用^[6]。专家们研究发现未阉公猪的唾液中也含有该化合物,其能使母猪的情绪变得激动而引诱公猪与其交配,所以国外常利用母猪的嗅觉来寻找块菌^[7]。α-雄烷醇也在男性的腋下汗液中被检测出来,研究表明该物质具有调节女性月经周期、引起女性兴奋的功能。α-雄烷醇很容易被氧化成雄烯酮类物质,从而使女性对男性产生负面的心理影响^[8]。虽然α-雄烷醇是否具有类似于性激素作用还不能完全确定,但法国人已把该化合物加到男性香水中,且价格十分昂贵。若对α-雄烷醇的提取及保藏过程进行较为合理的控制,该物质应该具有一定的药物开发潜力。

基于α-雄烷醇在哺乳类动物性行为方面的药用价值,国内已有不少专家对该化合物进行了化学合成方面的研究。早在1986年就有人用化学的方法合成了该化合物;随后1991年,张宇^[9]对其合成路线进行了改进,提高了收率。2002年,韩广甸等^[10]为了确定其生物学效应,以薯蓣皂素为原材料也合成了该化合物。但利用化学合成法存在着一些不足之处,如反应步骤太长,不利于实际的生产应用;合成过程中副

产物较多,不利于药物的分离纯化;化学法生产带有一定的化学危害性,不利于环保等。

2.2 神经酰胺:高锦明等^[11,12]对印度块菌子实体的活性成分进行了分析鉴定,首次分离得到4个新的神经酰胺类化合物(未命名),其化学结构式见图2。

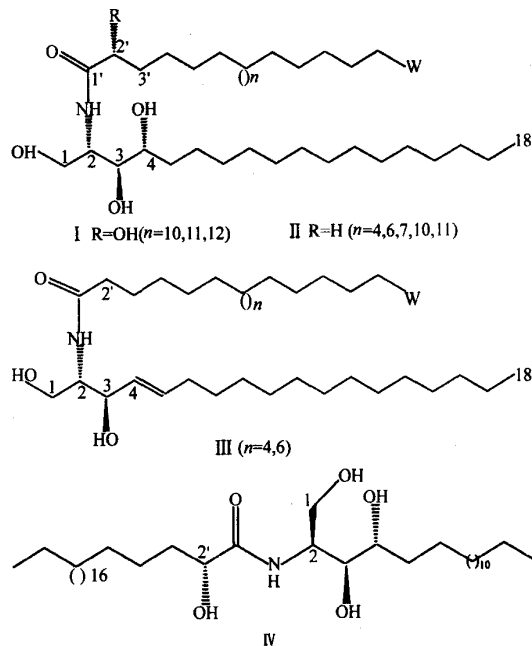


图2 印度块菌子实体中4种神经酰胺的化学结构
Fig. 2 Structures of four ceramides from fruiting body of *T. indicum*

神经酰胺作为一种天然的鞘脂类化合物,主要是由长链脂肪酸和鞘氨醇碱性骨架结构通过酰胺键相连形成的一系列化合物,由于受脂肪酸链的长短、不饱和键的位置和结构中取代基的影响,该类化合物的结构有所差别。关于神经酰胺的生理功能也有不少相关的文献报道,Filliet等^[13]的研究表明神经酰胺在细胞的生长和凋亡过程中起着重要的第二信使的作用,同时对维持细胞的渗透性和膜蛋白的稳定性起着不可忽视的作用。神经酰胺不仅有诱导细胞凋亡的作用,在特定的条件下在某些细胞中又可抑制细胞凋亡,这对于细胞的生长发育和老化、恶性肿瘤的治疗等均有重大意义^[14]。周全等^[15]在对神经酰胺的研究中指出该类物质作为人和动物的皮肤、指甲、头发中存在的主要脂类物质,对水分损失和来自环境中的物理、化学方面的有害损伤起着重要的屏障作用。蒲云峰等^[16]对神经酰胺的功能和应用进行了较系统地归纳,指出神经酰胺具有保湿(可以作为皮肤屏障)、抗肿瘤、诱导细胞凋亡、调节免疫等功能,越来越广泛地被应用于医药、食品和化妆品领域中。

2.3 块菌多糖:胡慧娟等^[17]首次从中国块菌的子实体中提取出一种新的蛋白结合多糖——块菌多糖,实验结果表明,块菌多糖作为一种新的真菌多糖,水溶性好、毒性低、抑制肿瘤作用明显,可望开发成抗肿瘤免疫疗法的药物。

3 块菌活性成分的生产方法

随着人们生活水平的不断提高,对块菌中含有的生物活性物质的开发有着广阔的发展空间。野生块菌的生长要求在石灰质等碱性土壤环境,与橡树、栎树等树种的根系共生;受不同气候条件的影响,产量不稳定,同时受虫害和人工采集损伤的影响使其品质较难控制;昂贵的价格更是难以满足大规模生产的需求。这就对这些生物活性物质的原料来源提出了挑战,针对块菌资源有限问题,国内外有不少专家进行了块菌的人工栽培实验。

3.1 块菌的半人工模拟栽培:欧洲人早就发现利用生长块菌的林地土壤来培育橡树幼苗,或是在生长黑孢块菌的林中挖取天然橡树树苗,将它们移植到其他适合的地方,几年之后橡树林中都可长出块菌来^[2]。随着菌根技术的不断发展,人们将块菌的子实体经匀浆后制成孢子悬液,或者将块菌的菌丝体接种在橡树等幼苗根部,让其形成带有菌根的菌根化苗木,将这些幼苗在适合的林地栽种,几年之后这片林地中就可以长出块菌来。这种前阶段工作在人工条件下完成,后阶段在自然条件下完成的块菌生活史被称为半人工模拟栽培(semiartificial simulation cultivation),该方法不仅在欧洲获得成功,在美洲、大洋洲以及亚洲一些国家和地区也同样获得成功^[18]。

自1970年以来,法国、意大利、西班牙、新西兰、澳大利亚等国家先后开展了可食块菌的商业化人工栽培,并取得了突破性进展,各国均有上百个块菌种植园。其中,法国最早采用半人工模拟栽培技术实现了黑孢块菌的商业化生产。我国台湾省于1998年宣布培育台湾块菌成功,随后国内不少学者展开了块菌半人工模拟栽培的研究。1998年起陈惠群等^[19,20]在对块菌生理和生态特性研究的基础上着重对中国块菌的生长特性进行了研究,结果表明中国块菌生长的最适温度为23~25℃,最适pH为5~6,在鲜松针综合培养基上生长迅速。弓明钦等^[18]对黑孢块菌的苗木根化条件进行了初步研究,发现利用黑孢块菌菌丝接种云南松、高山栎等幼苗后能不同程度的侵染幼苗并形成菌根,这一研究为开展利用块菌发酵菌丝体来进行半人工模拟栽培提供了廉价而丰富的种子来源。胡炳福等^[21]对印度块菌的菌根合成进行了研究,将印度块菌的子囊孢子接种于麻栎、华山松等幼苗,感染率达89.66%~100%,这也证实了利用块菌子囊孢子进行半人工模拟栽培的可行性。

常用的半人工模拟栽培技术主要有两种方案,即块菌子囊孢子接种法和块菌菌丝体接种法,但基本的工艺流程相似^[22,23],见图3。

3.1.1 宿主树种选择:块菌对宿主树种有较强的选择性和专一性,欧洲产黑孢块菌最常见宿主树种为橡树、榛子树等。我国的印度块菌、中国块菌等通常生长在云南松、华山松、栎树等林下。

3.1.2 育苗基质与营养的选择:应采用透气性好、质地松软的混合基质,还需高温消毒,宿主种子也要用AgNO₃等进行表面消毒处理。法国块菌菌根化苗圃常采用蛭石或珍珠岩为育苗基质。在营养方面,天冬酰胺等有机氮源及中等量的磷

万方数据

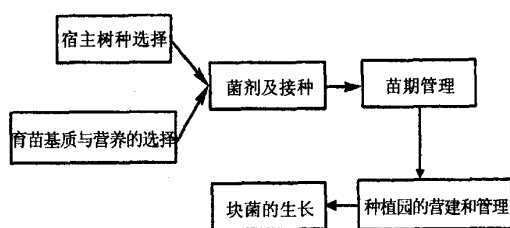


图3 块菌半人工模拟栽培工艺流程图

Fig. 3 Technical diagram of truffle semi-artificial simulation cultivation

素对块菌的菌根合成有显著促进作用,但基质中有机质量过高会对块菌的菌根合成产生一定的抑制作用。不同金属离子对块菌菌丝体生长的影响较大,促进作用的大小依次为Ca²⁺>Na⁺>K⁺>Mg²⁺。

3.1.3 菌剂及接种:欧洲主要采用子囊孢子接种法,其主要做法是将块菌子实体粉碎过筛后制成孢子悬液,自然干燥后与树皮等粉末混合配成一定浓度的菌剂,然后与消过毒的基质混匀,移栽至幼苗,在苗圃里生长1~2年后即可移栽到种植园。种植园通常采用透气性好、质地松软的混合基质,如蛭石和珍珠岩等,pH值7.9左右,含有一定的N、P、Ca等营养盐元素。

国内学者采用块菌的菌丝体接种法,将块菌菌丝体接种于摇瓶(150 r/min)中培养20 d,菌丝体干质量为50 mg/mL时接种到马尾松、云南松、高山栎等幼苗根部。接种前树苗种子用0.1% HgCl₂溶液表面消毒30 s,无菌水清洗3次后在沙床上进行催芽,苗高3~4 cm时进行移植。采用的基质为蛭石-泥炭-河沙(1:1.5:2),pH为5.2、每天两次淋浇自来水,每两周淋施复合肥(N:P:K=15:5:10)液1次^[22,23]。

3.1.4 苗期管理:块菌的感染依赖于根系的形态,中等大小的根系很容易感染块菌形成菌根,因此对盆栽块菌接种树幼苗进行修剪,可促使幼根密集分布,提高菌根感染率。适宜水分条件有利于宿主根系的发展,促进块菌菌根的合成。

3.1.5 种植园的营建和管理:种植园通常建立在石灰岩(质)地区,最好是在向阳的坡面上。近30年内最好没有林木,这样可以减少土壤中其他外生菌根菌对块菌的竞争性影响。同时在种植园里铺设灌溉系统,适时施加块菌专用肥。

3.1.6 块菌的生长:块菌菌丝体的发展是一个漫长的过程,从每年的夏季开始生长,子囊果同时慢慢形成,到冬季才能成熟。从种植园的建立到块菌的收获,一般需要6~7年的时间,才开始进入收获期。

半人工模拟栽培技术为弥补天然块菌产量有限和进行规模化生产提供了良好的技术平台,但仍存在不足之处,如块菌生长的周期较长,从接种到收获,一般需要7~9年的时间;将菌根根苗栽培于未消毒的土壤中,菌根极易消失或受到其他菌根菌的恶性竞争;受外界环境条件的影响大,块菌的质量不稳定;因温度、水分和营养必须保持在狭窄的范围内,温室内大规模生产菌根苗和子实体较困难^[24]。因此,若以块菌子实体为原料来生产α-雄烷醇和神经酰胺等生物活

性物质仍然存在着原料供应难和成本高等限制性因素。

3.2 发酵法生产块菌生物活性物质:目前块菌的人工栽培条件要求较苛刻,但其作为一种药食两用真菌,具有类似于灵芝等其他大型真菌的一些生理特点。通过控制适当的培养条件,块菌的菌丝体能够在液体培养基里迅速生长。因此,采用发酵的方法,利用廉价的培养基在发酵罐内培养块菌菌丝体,具有周期短、成本低、操作简单、易培养、能够按照需求人为的控制原料供应量等众多优势。同时利用微生物代谢工程的原理,可以有针对性地对块菌菌丝体的生长进行代谢调控,使发酵朝着有利于 α -雄烷醇、神经酰胺、块菌多糖等活性物质生成的方向发展。

利用廉价易得的块菌菌丝体为原料来提取 α -雄烷醇、神经酰胺、块菌多糖等生物活性物质的方法类似于以块菌子实体为原料的提取方法,仅需对原有的方案进行一定的优化。到目前为止,国内外对块菌的研究都局限于块菌的发现、生态环境调查、营养成分分析和分类等,目前还没有关于利用块菌发酵生产 α -雄烷醇、神经酰胺、块菌多糖等活性物质的报道。因此,利用块菌发酵来生产这些活性物质具有广阔的市场前景和应用价值。

4 小结与展望

块菌作为一种药食两用真菌,备受欧美市场的青睐,每千克新鲜黑孢块菌的价格更是高达1千多美元。块菌除了本身味美外,亦含有多多种生物活性物质,如含有的 α -雄烷醇是一种能调节女性月经周期和性功能的类固醇化合物;神经酰胺是一种天然的人体皮肤保湿成分,可用于化妆品的开发,同时可以用作抗衰老、抗肿瘤、调节免疫功能的药物;块菌多糖具有抗肿瘤和调节免疫功能的作用。但是,自然界中块菌需要在碱性土壤环境中与橡树、栎树等树种的根系共生,且长年埋没于地下难以被发现,产量相当有限。利用半人工模拟栽培技术获取块菌子实体,从接种到幼苗收获一般需要7~9年时间。因此,直接利用块菌子实体作为大规模生产 α -雄烷醇、神经酰胺、块菌多糖等生物活性物质的原料难以实现。块菌发酵能在短时间内获得大量菌丝体,同时具有易培养、可控制、培养周期短、廉价等优点,利用块菌发酵来生产这些活性物质具有广阔的市场前景和应用价值。本实验室正在开展这方面的工作。

References:

- [1] Chen H Q, Liu H Y, Yang X M, et al. Studied on the ecological and physiology property of truffle [J]. *Resour Dev Market* (资源开发与市场), 1999, 15(1): 11-15.
- [2] Chen Y L. Mycorrhizal formation of *Tuber melanosporum* [J]. *Edib Fungi China* (中国食用菌), 2002, 21(5): 15-17.
- [3] Hu B F, Prospect on the research and commercial application of truffle in Guizhou Province [J]. *Guizhou Forest Sci Technol* (贵州林业科技), 2003, 31(1): 10-16.
- [4] Comandini O, Pacioni G. Mycorrhizae of Asian black truffles, *Tuber himalayense* and *T. indicum* [J]. *Mycotaxon*, 1997, 63: 77-86.
- [5] Bradshaw D. *Vertebrate Ecophysiology: An Introduction to Its Principles and Applications* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.
- [6] Brooksbank B W L, Haslewood G A D. The isolation of androst-16-en-3 α -ol from women's urine [J]. *Biochem J*, 1952, 51: 286-288.
- [7] Brennan P A, Keverne E B. Something in the air? New insights into mammalian pheromones [J]. *Curr Biol*, 2004, 14: 81-88.
- [8] Kohl J V, Atzmüller M, Fink B, et al. Human pheromones: integrating neuroendocrinology and ethology [J]. *Neuroendocrinol Lett*, 2001, 22: 309-321.
- [9] Zhang Y, Huang J Z, Wang D J, et al. Modifying the synthetic method of the pig exohormone 5-androst-16-en-3-ol [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1991, 22(6): 367-368.
- [10] Han G D, Ma Z Y. Development of synthesis of steroid drugs from Tigogenin in China [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2002, 33(9): 459-464.
- [11] Gao J M, Zhang A L, Wang C Y, et al. A new ceramide from the ascomycete *Tuber indicum* [J]. *Chin Chem Lett*, 2002, 13(4): 325-326.
- [12] Gao J M, Zhang A L, Chen H, et al. Molecular species of ceramides from the ascomycete truffle *Tuber indicum* [J]. *Chem Phys Lipids*, 2004, 131: 205-213.
- [13] Fillet M, Van Heugen J C, Servais A C, et al. Separation, identification and quantitation of ceramides in human cancer by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 949: 225-233.
- [14] Jing Z H, Li W, Pang H Z. Ceramide and apoptosis [J]. *Prog Biochem Biophys*, 1999, 26(6): 537-541.
- [15] Zhang M L, Xie J P, Zhou Q, et al. On-line solid-phase extraction of ceramides from yeast with ceramide III imprinted monolith [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 984: 173-183.
- [16] Pu Y F, Zhang W M, Zhang G. Application and function of ceramide. [J]. *Cereals Oils* (粮食与油脂), 2005, 7: 14-16.
- [17] Hu H J, Li P Z, Lin T, et al. Effects of polysaccharide of *Tuber sinica* on tumor and immune system of mice [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1994, 125(5): 289-292.
- [18] Gong M Q, Chen Y, Wang F Z. A Study of Mycorrhizal Synthesis Effect of *Tuber melanosporum* on Seedlings [J]. *Forest Res* (林业科学研究), 2003, 16(1): 52-57.
- [19] Liu H Y, Chen H Q, Li Z P, et al. Nutrition value and exploitation of truffle [J]. *Resour Dev Market* (资源开发与市场), 1997, 13(12): 61-66.
- [20] Chen H Q, Liu H Y. A preliminary study on the main physiological characteristics of *Tuber sinense* [J]. *Acta Edulis Fungi* (食用菌学报), 1998, 5(4): 26-30.
- [21] Hu B F, Zhu Z R, Yuan X M, et al. Mycorrhizal formation effect of *Tuber indicum* on the seedlings of growth and the sickness defend [J]. *Guizhou Forest Sci Technol* (贵州林业科技), 2004, 32(2): 19-24.
- [22] Chen Y L. Cultivation techniques for European truffles (*Tuber* spp.) [J]. *Edib Fungi China* (中国食用菌), 2002, 21(1): 7-11.
- [23] Yao F J, Zhang Y M, Wang X O, et al. Research progress for cultivation of edible truffles [J]. *J Northeast Forest Univ* (东北林业大学学报), 2004, 32(6): 95-96.
- [24] Tan Z M, Fu S C, Zhou X L, et al. Advance in the researches on mycorrhizal edible fungi [J]. *Acta Edib Fungi* (食用菌学报), 2003, 10(3): 56-63.