

# 银耳杨梅霜病发病机理及其病原菌抗菌谱的测定

李 兵<sup>1,2</sup>, 温 志 强<sup>1</sup>

(1. 福建农林大学 生命科学学院, 福建 福州 350002; 2. 淮安市疾病预防控制中心, 江苏 淮安 223001)

**摘 要:**以银耳杨梅霜病发病菌筒为试材,采用平板培养及分子生物学方法,研究了杨梅霜病病原菌的生物学特性及抗菌谱。结果表明:分离到3株病原菌Js-1<sup>T</sup>、Js-2、Js-3的形态特征和培养特性相同,16S rDNA酶切带型完全一致,三者为重复菌株;回接试验证实Js-1<sup>T</sup>菌株为杨梅霜病的病原菌;对峙培养试验表明,Js-1<sup>T</sup>菌株产生的抗菌物质抑制香灰菌和银耳菌丝的生长;16S rDNA序列分析表明,Js-1<sup>T</sup>菌株与链霉菌属菌株 *Streptomyces hebeiensis* strain NBRC 101006<sup>T</sup> 的同源性最高为97.62%。结合形态特征和分子生物学分析,证明Js-1<sup>T</sup>菌株属于链霉菌属。同时测定了Js-1<sup>T</sup>菌株的抗菌谱,其对大肠杆菌的抑菌圈直径为2.76 cm,对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径为1.26 cm;对真菌核盘菌、有害疣孢霉菌、稻瘟菌、木霉、根霉的抑菌圈直径分别为4.29、4.07、3.85、3.37、2.90 cm。此外,对镰刀菌和香蕉枯萎病菌天蓝一号也具有一定的抑制作用。

**关键词:**银耳杨梅霜病;病原菌;抗菌谱

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0114-04

银耳是福建省食用菌产业中的拳头产品,年产量达1.96万t,占全国总产量的89.5%,其中福建省古田县银耳产量(干品)达1.76万t,占福建省银耳总量的89.8%,被誉为“银耳之乡”<sup>[1]</sup>。但是,近年来杨梅霜病在银耳栽培过程中频繁爆发,给当地银耳生产带来了很大的经济损失。目前有关杨梅霜病害的研究很少,对其发病原因尚不清楚,给防治工作带来了困难。林成辉等<sup>[2]</sup>在杨梅霜病的发病部位没有发现病原菌,认为白色霜状物实际为死亡的银耳菌体或其分泌物,而由高温、病毒或菌种蜕变引发的银耳菌种退化是造成菌体死亡的真正原因。戴维浩等<sup>[3]</sup>则认为杨梅霜病是由放线菌污染引起的,对分离出的病原菌的形态和生物学特性进行了初步研究,但具体分类地位不清楚,并且这种解释还未经过柯赫氏法则验证。现对杨梅霜病的发病机理进行研究,并测定了杨梅霜病原菌的抗菌谱,以期对杨梅霜病的防治提供了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为银耳杨梅霜病发病菌筒,采集于福建省古田县。

**第一作者简介:**李兵(1986-),男,江苏淮安人,硕士,研究方向为应用微生物学与基因工程。E-mail:leeb1002@163.com.

**责任作者:**温志强(1964-),男,本科,教授,研究方向为食用菌及病虫害防治。E-mail:546650546@qq.com.

**基金项目:**国家支撑计划资助项目(2013BAD16B03)。

**收稿日期:**2015-09-24

指示菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、有害疣孢霉菌(*Mycogone perniciosa*)、稻瘟菌(*Pyricularia grisea*)、木霉(*Trichoderma viride*)、根霉(*Rhizopus stolonir*)由福建农林大学菌物研究中心提供;镰刀菌(*Fusarium*)、菌核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、香蕉枯萎病菌天蓝一号(*Banana vascular wilt*)由福建农林大学功能基因组学研究中心提供。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 病原菌的分离** 用75%酒精对银耳菌筒的发病部位进行表面消毒,从发病部位表层处刮取白色霜状物放入经灭菌处理的三角瓶中,加入100 mL无菌水并充分摇匀,利用梯度稀释法进行稀释,然后吸取50  $\mu$ L不同稀释倍数的悬液到PDA培养基上,用涂布棒涂布均匀后倒置于28℃培养箱中进行培养,待菌落长出后利用划线法进行纯化。

**1.2.2 分离菌株的鉴定** 观察并记录分离菌株的菌落形态、显微形态和培养特性。并根据张蕾等<sup>[4]</sup>提供的方法提取菌株的基因组DNA,利用引物16Sr和16Sf扩增16S rDNA。反应体系为:DNA模板1  $\mu$ L,10×PCR buffer 2.5  $\mu$ L,2.5 mmol/L dNTPs 1.5  $\mu$ L,引物16Sr和16Sf各1  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L *rTaq* 酶0.3  $\mu$ L,无菌ddH<sub>2</sub>O 17.7  $\mu$ L。扩增条件为:94℃预变性5 min,94℃变性45 s,56.9℃复性45 s,72℃延伸90 s,运行35个循环,72℃延伸10 min。然后利用*EcoRV*、*PstI* 2种酶分别对Js-1<sup>T</sup>、Js-2、Js-3菌株的16S rDNA片段进行酶切分析。将菌株的16S rDNA测序结果提交到NCBI数据库中,并使用NCBI在线BLAST软件进行比对<sup>[5]</sup>,下载与其同源性较高的且

已有效发表种的 16S rDNA 序列,然后用 ClustalX 软件对 Js-1<sup>T</sup> 及相关菌株的 16S rDNA 序列进行同源性比对<sup>[6]</sup>。

1.2.3 柯赫氏法则验证 用无菌接种环从固体 PDA 培养基上挑取一环纯培养物于液体 Bennett 培养基中,28℃ 培养 72 h,供回接试验使用。采用杨顺锦等<sup>[7]</sup>介绍的注射法进行回接,分别将 20、10、5 mL 的菌悬液注入到银耳菌筒接种穴处以及菌袋背部,同时以注射无菌水的菌筒作为阴性对照,每处理设置 3 个重复。注射完成以后,在注射处粘贴经消毒处理的胶布,防止外界杂菌进入。进行银耳出菇管理,定期观察发病情况。出菇结束后从发病的银耳菌筒再次分离纯化病原菌。

1.2.4 发病机理的研究 将病原菌与香灰菌以及银耳芽孢分别进行对峙培养,观察菌株对香灰菌和银耳芽孢生长的影响。

1.2.5 病原菌抗菌谱的测定 采用“十”字交叉法<sup>[8]</sup>,将直径为 1 cm 的病原菌的菌饼接种到 PDA 平板中心位置,将直径为 1 cm 的指示真菌的菌饼接种到“十”字线两端距离中心 3 cm 处,置于 25℃ 下培养,同时以只接种指示真菌菌饼的培养皿作为对照组,每种处理设置 3 个重复。待对照组的真菌接近长满培养皿时开始测量抑菌圈的大小。取 5 mL 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌分别加入到 90 mL 温度为 40℃ 左右的固体 PDA 培养基中,混合均匀后倒平板,待培养基凝固后在平板中心位置接种直径为 1 cm 的病原菌的菌饼,每种细菌设置 3 个重复。37℃ 培养 48 h,然后测量抑菌圈的大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌的分离鉴定

从银耳菌筒的发病部位共分离到 3 株病原菌,分别编号为 Js-1<sup>T</sup>、Js-2、Js-3。在 PDA 平板上 3 个菌株的菌落均呈同心圆状、凸起、边缘绒毛状,气生菌丝发达、白色至灰白色,基内菌丝黄褐色,均可产生棕灰色水溶性色素(图 1)。100 倍物镜下显微观察显示 3 个菌株的气生菌丝均会进一步分化为直至波曲状的孢子丝(图 2)。

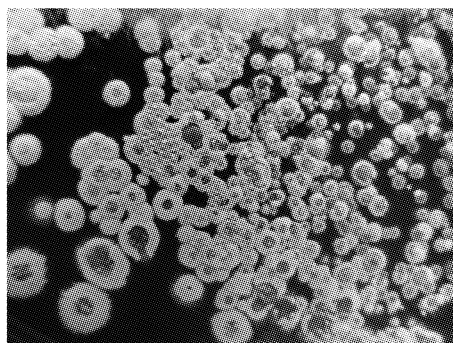


图 1 PDA 培养基上的菌落形态

Fig. 1 The morphological specificity on PDA

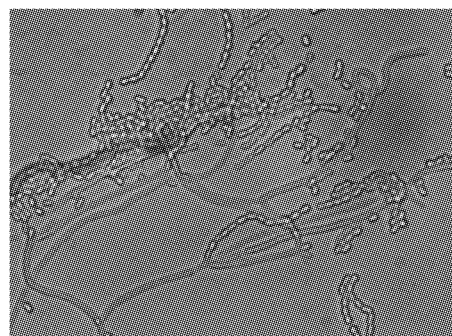


图 2 气生菌丝及孢子丝(100×)

Fig. 2 Micrograph of aerial mycelium and spore chains (100×)

如图 3、4 所示,Js-1<sup>T</sup>、Js-2、Js-3 菌株的 16S rDNA 片段(分别为 1、3、5 泳道)大小一致,均为 1 500 bp 左右,并且经 *Pst*I 和 *Eco*RV 酶切后片段长度多态性一致。综合以上试验结果,说明 3 个菌株为相同的菌种。

Js-1<sup>T</sup> 菌株的 16S rDNA 序列全长为 1 487 bp。通过 BLAST 比对后,与大部分链霉菌属菌株的 16S rDNA 序列同源性较高,下载这些同源性较高的序列,并用 ClustalX 软件做进一步同源性分析。结果表明,Js-1<sup>T</sup> 菌株的 16S rDNA 序列与 *Streptomyces hebeiensis* strain NBRC 101006<sup>T</sup> 的同源性最高为 97.62%。结合形态和分子生物学分析,证明 Js-1<sup>T</sup> 菌株属于链霉菌属。

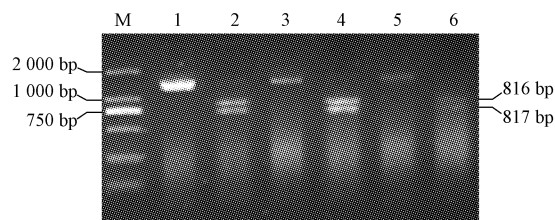


图 3 *Pst*I 酶切结果

Fig. 3 The result of *Pst*I restriction of 16S rDNA

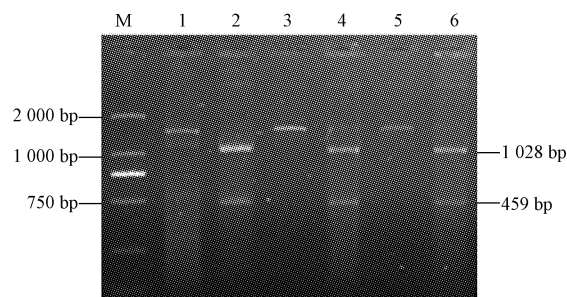


图 4 *Eco*RV 酶切结果

Fig. 4 The result of *Eco*RV restriction of 16S rDNA

### 2.2 柯赫氏法则验证

被注射 Js-1<sup>T</sup> 菌株的银耳菌筒发病状况见图 5。在回接部位栽培料表面长出霜状、白色的菌落,同时散发出浓重的土腥气味。回接处银耳菌丝与香灰菌都不能



够生长。被回接的银耳菌筒子实体的产量受到明显影响,回接量为 10、5 mL 时,子实体比正常菌袋子实体小,当回接量达到 20 mL 时,子实体产量为零。回接菌筒的发病状况与杨梅霜病的症状一致。

从回接菌筒发病部位分离得到的病原菌在 PDA 平板上气生菌丝呈白色至灰白色、基内菌丝为褐黄色、水溶性色素为棕灰色,培养特征与 Js-1<sup>T</sup> 菌株一致,说明 Js-1<sup>T</sup> 菌株为引发杨梅霜病的病原菌。

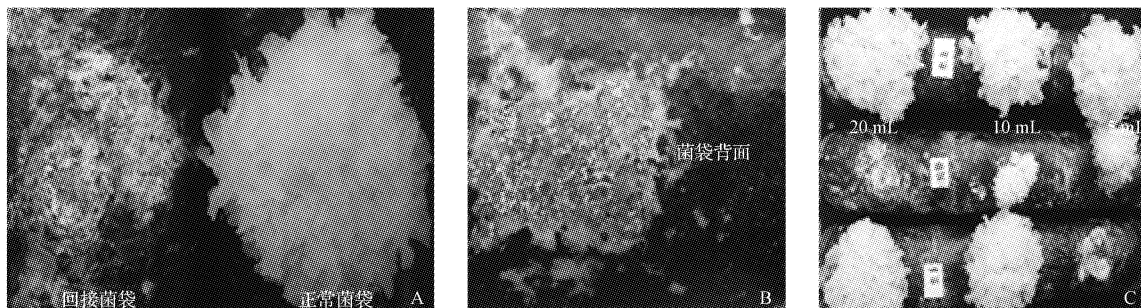


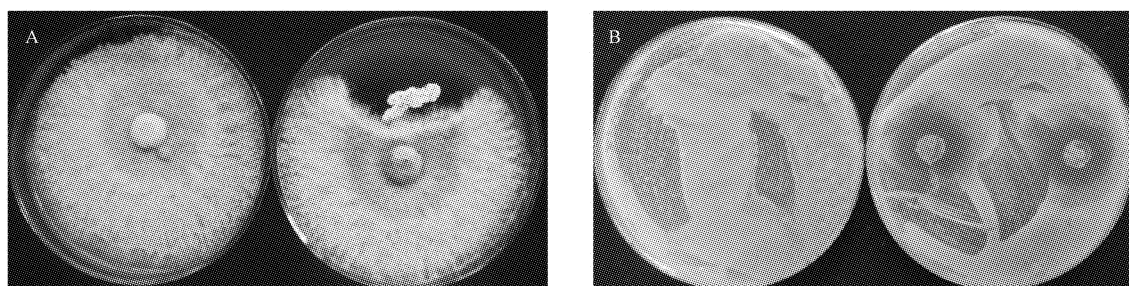
图 5 接种 Js-1<sup>T</sup> 后银耳菌袋的发病症状

Fig. 5 Symptoms of *Tremella fuciformis* bed-log after artificial inoculation with strain Js-1<sup>T</sup>

### 2.3 杨梅霜病的发病机理

如图 6 所示,香灰菌在与 Js-1<sup>T</sup> 菌株对峙培养时,生长受到明显抑制,靠近 Js-1<sup>T</sup> 菌株一侧的菌丝不能生长,并且产黑色素的时间延迟。由于银耳菌丝在 PDA 培养

基上面很难生长,且极易转变为芽孢,故选用银耳芽孢与 Js-1<sup>T</sup> 菌株进行对峙试验,结果显示 Js-1<sup>T</sup> 菌株抑制银耳芽孢的生长。由此推测,Js-1<sup>T</sup> 菌株产生的抗菌物质抑制了香灰菌和银耳菌丝的生长,致使银耳减产甚至绝产。



注:A,Js-1<sup>T</sup> 菌株对香灰菌的抑制作用;B,Js-1<sup>T</sup> 菌株对银耳芽孢的抑制作用。

Note: A, antimicrobial effect of Js-1<sup>T</sup> on Xianghui; B, antimicrobial effect of Js-1<sup>T</sup> on *Tremella gemma*.

图 6 Js-1<sup>T</sup> 菌株的致病机理

Fig. 6 The pathogenic mechanism of strain Js-1<sup>T</sup>

### 2.4 Js-1<sup>T</sup> 菌株的抑菌谱

将大肠杆菌和枯草芽孢杆菌分别混入 PDA 培养基并倒入培养皿中,培养结束时菌落布满整个培养皿呈不透明状态。由表 1 可知,接有 Js-1<sup>T</sup> 菌饼的培养皿,在 Js-1<sup>T</sup> 菌饼周围 2 种细菌均不能够生长,出现明显的透明圈,对大肠杆菌的抑菌圈为 2.76 cm,对枯草芽孢杆菌的抑菌圈为 1.26 cm,说明 Js-1<sup>T</sup> 菌株对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌均具有明显的抑制作用。Js-1<sup>T</sup> 菌株对核盘菌、有害疣孢霉菌的抑制作用最显著,在对峙培养时 2 类病原真菌基本不能生长;对木霉、根霉、稻瘟菌也具有较明显的抑制作用,产生的抑菌圈直径均在 2.90 cm 以上;Js-1<sup>T</sup> 菌株对镰刀菌和香蕉枯萎病菌也具有抑制作用,使 2 种致病菌的菌落形态发生变异,致使镰刀菌产生的红色素减少、香蕉枯萎病菌菌丝变稀薄,但是抑菌圈不够明显。

表 1 Js-1<sup>T</sup> 菌株对指示菌的抑菌效果

Table 1 The antimicrobial effect of Js-1<sup>T</sup> on microorganisms

| 菌株             | 抑菌圈大小     | 抑菌效果                 |
|----------------|-----------|----------------------|
| Strains        | Size/ cm  | Antimicrobial effect |
| 大肠杆菌           | 2.76±0.10 | 效果显著                 |
| 枯草芽孢杆菌         | 1.26±0.06 | 效果显著                 |
| 核盘菌            | 4.29±0.12 | 效果极显著                |
| 有害疣孢霉菌         | 4.07±0.05 | 效果极显著                |
| 稻瘟菌            | 3.85±0.05 | 效果极显著                |
| 木霉             | 3.37±0.18 | 效果显著                 |
| 根霉             | 2.90±0.08 | 效果显著                 |
| 镰刀菌            | 有抑制作用     | 使红色素减少               |
| 香蕉枯萎病菌(“蓝天一号”) | 有抑制作用     | 使菌丝变稀薄               |

### 3 讨论

该试验从银耳杨梅霜病发病部位分离到 3 株病原菌,3 个菌株在 PDA 平板上的培养特征相同,ARDRA 分析多态性一致,说明 3 个菌株为重复菌株。经柯赫氏

法则验证,首次证实了银耳杨梅霜病的病原菌为链霉菌属的 Js-1<sup>T</sup> 菌株。YARZA 等<sup>[9]</sup>认为 16S rRNA 相似性低于 95% 的菌株可以归为不同的属;STACKEBRANDT 等<sup>[10]</sup>认为 16S rRNA 相似性≥98.7%~99.0% 的 2 株放线菌属于同一个种,而 Js-1<sup>T</sup> 菌株的 16rDNA 序列与其它链霉菌的同源性均在 98.0% 以下,因此,Js-1<sup>T</sup> 菌株极有可能是链霉菌属的一个新种。

放线菌可以产生大量有价值的代谢产物,而其代谢产物中最主要的便是抗生素类。一类抗生素可以抑制某些细菌或真菌的生长,因此许多链霉菌属的菌株表现出拮抗活性。Js-1<sup>T</sup> 菌株的致病原因就在于其产生的拮抗物质抑制了银耳菌和香灰菌的生长。该研究结果为深入研究杨梅霜病的传播途径、病害检疫以及防治提供了重要依据。

据相关文献报道 *Streptomyces tumenensis* BPS2<sup>[11]</sup>、St-145 菌株<sup>[12]</sup>、放线菌 769<sup>[13]</sup> 对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌具有拮抗作用;放线菌 1A<sup>[14]</sup> 对稻瘟菌具有抑菌作用,菌株 WZ254<sup>[15]</sup> 对香蕉枯萎病菌具有抑制作用,生防放线菌 SW9、SW6 等对镰刀菌具有抑制作用,而这些放线菌中有些菌株已经被证实可以产生一些抗生素物质。此外,Js-1<sup>T</sup> 菌株对核盘菌、有害疣孢霉菌、木霉、根霉也具有拮抗作用,这在目前已经发现的放线菌菌株中报道较少,因此,Js-1<sup>T</sup> 菌株在生产抗生素物质方面有较好的开发潜能。Js-1<sup>T</sup> 菌株的具体分类地位、生物学特性以及所产生的拮抗物质的提取等是今后研究的重点方向。

#### 参考文献

[1] 张海风. 感病银耳中微生物的 T-RFLP 分析[D]. 福州: 福建农林大

学,2011.

[2] 林成辉,唐乐尘. 白木耳“杨梅生病”和“死菌”原因探讨[J]. 中国食用菌,2000,19(2):23.

[3] 戴维浩,戴伟鸿. 银耳杨梅霜病的污染现象和防治方法[J]. 浙江食用菌,2010,18(2):48.

[4] 张蕾,张金涛,杨文博,等. 链霉菌 Z314 的分类鉴定及其转化产物普伐他汀的纯化研究[J]. 微生物学报,2008,48(1):33-37.

[5] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHÄFFER A A, et al. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Res,1997,25:3389-3402.

[6] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res,1997,24:4876-4882.

[7] 杨顺锦,詹儒林,柳风,等. 金沙江干热河谷地区芒果畸形病的病原菌[J]. 菌物学报,2011,30(1):27-31.

[8] 疏秀林,安德荣,张勤福,等. 土壤拮抗放线菌 S2521026 的筛选及其初步分类鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(12):57-60.

[9] YARZA P, RICHTER M, PEPLIES J, et al. The all-species living tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains[J]. Syst Appl Microbiol,2008,31:241-250.

[10] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. Int J Syst Bacteriol,1994,44:846-849.

[11] 曹广丽. 番茄叶霉菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及发酵条件研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学,2006.

[12] 何鸿洪. 番茄青枯病拮抗放线菌的筛选研究[D]. 南宁: 广西大学,2006.

[13] 隋丽. 放线菌 769 对水稻抗稻瘟病的诱导抗性研究[D]. 长春: 吉林农业大学,2008.

[14] 刘丽玲. 人参锈腐病病原放线菌发酵条件及抗生素分离提取[D]. 长春: 吉林农业大学,2008.

[15] 何娜. 五指山放线菌分离菌株活性测定及 WZ254 菌株产生的抗生素分离纯化[D]. 海口: 海南大学,2008.

## Pathogenicity Mechanism of Yang Mei Shuang Disease on *Tremella fuciformis* and Inhibition Spectrum of the Pathogenic Bacterium

LI Bingbing<sup>1,2</sup>, WEN Zhiqiang<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 2. Huai'an Center for Disease Control and Prevention, Huai'an, Jiangsu 223001)

**Abstract:** Taking *Tremella fuciformis* artificial bed-log which was infected with Yang mei shuang disease as materials, plate cultivation and molecular biology methods were used to study the biological characteristics and antibacterial spectrum of pathogenic bacterium. The results showed that the colonies characteristics and cultural characteristics of the three pathogen strains Js-1<sup>T</sup>, Js-2 and Js-3 were the same as PDA culture. And the 16S rDNA of three strains had the same bands after digestion, so these strains were repeated strains. Strain Js-1<sup>T</sup> was confirmed to be the pathogen of this disease through Koch's rules. Strain Js-1<sup>T</sup> had strong inhibition on *xiang hui* and *tremella* gemma, which could be the cause of the disease. 16S rDNA sequence analysis showed that strain Js-1<sup>T</sup> had the highest similarity with *Streptomyces hebeiensis* strain NBRC 101006<sup>T</sup>, reaching 97.62%. The results of cultural characteristics and molecular biological analysis showed that strain Js-1<sup>T</sup> belonged to *Streptomyces*. What's more, the antibacterial activity of strain Js-1<sup>T</sup> was determined. The results showed that strain Js-1<sup>T</sup> had strong inhibition against these tested strains. The diameters of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* were 2.76 cm and 1.26 cm, respectively. The diameters of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycogone perniciosa*, *Pyricularia grisea*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus stolonir* were 4.29, 4.07, 3.85, 3.37 and 2.90 cm, respectively. In addition, strain Js-1<sup>T</sup> had antibacterial activity to *Fusarium* spp and *Banana vascular wilt*.

**Keywords:** Yang mei shuang disease on *Tremella fuciformis*; pathogenic bacterium; inhibition spectrum