

DOI:10.11937/bfyy.201708030

平菇锈斑病病原菌鉴定及其部分生理特性

陈雪凤, 吴小健, 王灿琴, 吴圣进, 韦仕岩

(广西农业科学院 微生物研究所, 广西 南宁 530007)

摘要:以感染锈斑病的平菇为试材,采用组织分离法、柯赫法则、病原菌 16S rDNA 序列测定的方法分离并鉴定病原菌;采用测定细菌生物量的方法测定病原菌的适宜生长温度、酸碱度和盐度;采用抑菌圈法检测病原菌对抗生素敏感性,以期为研究病害发生与流行规律以及探索有效防治措施奠定基础。结果表明:锈斑病病原菌鉴定为托拉斯假单胞杆菌 *Pseudomonas tolaasii*;该病原菌适生长的温度为 21~30 ℃,适宜生长 pH 为 7~8,适宜生长盐度为 0.5%~2.5%;该病原菌对红霉素、氨苄青霉素不敏感;对链霉素、四环素、庆大霉素和土霉素的最低抑制浓度分别为 312.0、156.0、78.0、78.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词:平菇;锈斑病;鉴定;生理特性

中图分类号:S 436.46 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)08-0132-04

平菇(*Pleurotus ostreatus*)具有适应性强、栽培料来源广泛、栽培方法简单易行、成本低、产量高、生长期短、经济效益高等特性,是我国栽培量最大的食用菌品种。随着平菇栽种面积不断扩大,使得平菇锈斑病发病率逐年上升,不但影响商品价值,还会影响下茬菇的正常生长,并能引起其它病害和虫害的交叉感染。特别是在老产菇区更为突出,给众多菇农造成了重大的损失,大大打击了菇农种植平菇的积极性。

平菇锈斑病病症与孙婕等^[1]、决超等^[2]、刘新华等^[3]报道的褐斑病、细菌性腐烂病和黄斑病病症有相似之处,但也存在差异。明确病害病原菌的种类是防治病害前提,因此,为了有效防治该病害,该试验开展了病原分离、鉴定及生理特性的研究,以期为进一步研究病害发生与流行规律,以及探索有效防治措施等奠定基础。

第一作者简介:陈雪凤(1976-),女,本科,高级农艺师,现主要从事食用菌育种及推广等工作。E-mail: xuefeng767@126.com.

责任作者:韦仕岩(1965-),男,硕士,研究员,现主要从事食用菌育种等研究工作。E-mail: weisy0608@163.com.

基金项目:广西农业科学院基本科研业务专项资助项目(2015JZ59);国家食用菌产业技术体系广西创新团队建设专项资金资助项目(nycytxgxcxt-d-07-02)。

收稿日期:2016-12-13

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试平菇锈斑病病原菌从广西食用菌产区发病平菇子实体上分离纯化而得,保存于广西农业科学院微生物研究所食用菌育种研究室。

供试 NA 培养基:牛肉浸膏 3 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。NB 培养基:为 NA 的液体培养基。

供试抗生素:硫酸庆大霉素(98%, Solarbio),红霉素(98%, Solarbio),盐酸四环素(98%, Solarbio),氨苄青霉素钠(98%, Solarbio),硫酸链霉素(650~850 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$, Solarbio),盐酸土霉素(900 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$, Solarbio)。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离鉴定 从广西平菇产区采集锈病发病初期的子实体,采用平皿划线法分离并纯化病原菌^[4-5];将纯化好的病原菌配成 1×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 菌悬液,采用喷雾法接种到直径 1~2 cm 的平菇子实体上,环境温度 18~23 ℃,湿度 80%左右,36 h 后观察子实体发病情况。再对发病的平菇子实体进行病原菌分离纯化,获得其病原菌。病原菌的鉴定:对经过接种发病并重新分离到的平菇病原菌进行基因组 DNA 提取,对 16S rDNA 的保守序列进行 PCR 扩增,对纯化的 PCR 产物进行序列测序,将所得序列与 NCBI 数据库比较,确定病原菌的种属。

1.2.2 病原菌生长适宜温度的测定 在容量为

250 mL 的三角瓶内装 50 mL NB 培养基,高温高压灭菌 30 min,培养基冷却后接入浓度为 1×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 病原菌悬液 100 μL ,然后放入不同温度(12、15、18、21、24、27、30、33、36 $^{\circ}\text{C}$)的振荡培养箱 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 24 h 后,用岛津 UV-1600 分光光度计 650 nm 下测量其菌悬液的 OD 值,每处理 3 次重复,以不接菌悬液的 NB 培养基作对照。

1.2.3 病原菌生长适宜 pH 的测定 配制 NB 培养基,用 HCl 和 NaOH 调节 pH,使灭菌后的培养基 pH 分别为 4、5、6、7、8、9、10,量取 50 mL 装入 250 mL 的三角瓶中,高温高压灭菌 30 min,冷却后接入浓度 1×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的病原菌悬液 100 μL ,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养箱中 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 24 h 后,用岛津 UV-1600 分光光度计在 650 nm 下测量其菌悬液的 OD 值。以没有接菌悬液的 NB 培养基为对照。每处理 3 次重复。

1.2.4 病原菌耐盐性的测定 用 NaCl 调节 NB 培养基盐度分别达 0.0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%,量取 50 mL 装入 250 mL 的三角瓶中,高温高压灭菌 30 min,冷却后,接入浓度为 1×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的病原菌悬液 100 μL ,然后放入 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养箱 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 24 h 后,用岛津 UV-1600 分光光度计于 650 nm 下测量其菌悬液的 OD 值,以没有接菌悬液盐度 0% 的 NB 培养基为对照,每处理 3 次重复。

1.2.5 病原菌抗生素敏感性的测定^[6] 将液体培养 24 h 的菌液与温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 左右的 NA 培养基按照 1:15 的比例混合,摇匀后倒平板,在超净台内风干,制成含菌平板备用。在同一含菌平板上放入直径为 0.6 cm 的滤纸片,在每个滤纸片移入 25 μL 浓度为 5 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 不同的抗生素,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后,取出观察并测量抑菌圈大小。

1.2.6 不同敏感抗生素对病原菌 MIC(最低抑制浓度)的测定 在同一含菌平板上放入直径为 0.6 cm 滤纸片 9 个,在滤纸片上移入 25 μL 浓度分别为 5 000.0、2 500.0、1 250.0、625.0、312.0、156.0、78.0、39.0、19.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 同一抗生素,每个抗生素设 3 皿重复,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后,取出观察并测量抑菌圈大小。所选抗生素为 1.2.5 中筛选的敏感抗生素。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离

由图 1~3 可知,发病部位与发病症状均与自然发病的症状相同,从接种发病的平菇子实体上也可以重新分离到病原菌,由此可判定分离病原为平菇锈斑病病原菌。



图 1 接种病原菌的子实体发病症状

Fig. 1 Disease symptom of the sporocarp inoculated pathogen



图 2 不接种病原菌的子实体(对照)

Fig. 2 Health sporocarp without inoculated pathogen (CK)



图 3 自然发病的子实体症状

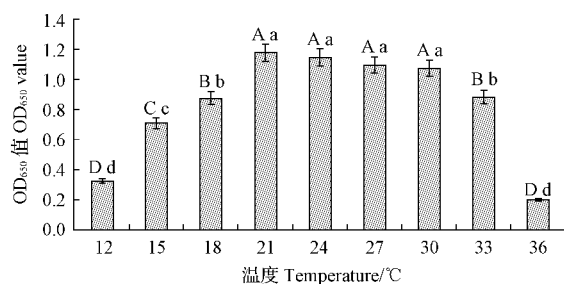
Fig. 3 Disease symptom of the sporocarp natural infected by pathogen

2.2 病原菌的鉴定

病原菌经 DNA 提取、PCR 扩增、16S rDNA 序列测定,与 NCBI 数据库里对比相似度达 99% 最高的是 *Pseudomonas tolaasii* strain HMF2483,因此,判断平菇锈斑病该病原菌为托拉斯假单胞杆菌(*Pseudomonas tolaasii*)。

2.3 温度对病原菌生长的影响

由图 4 可知,随温度的升高,供试菌株的生物量增加,在 21 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最高值,随着温度的继续升高,生物量开始逐渐减少。在 21~30 $^{\circ}\text{C}$ 的病原菌生长量差异不显著,表明供试菌株适宜生长的温度范围 21~30 $^{\circ}\text{C}$,最适温度是 21 $^{\circ}\text{C}$ 。



注:大写字母代表 Tukey 测验的 0.01 差异显著水平,小写字母代表 0.05 差异显著水平。下同。

Note: The capital and lowercase letters indicate the difference at 5% and 1% level respectively by Tukey test. The same below.

图 4 病原菌在不同温度下的生长情况

Fig. 4 Growth status of pathogen at different temperatures

2.4 pH 对病原菌生长的影响

由图 5 可知,在 pH 4~8 时,随 pH 的升高,供试菌株的生物量增加,pH 8 时生物量达最大,pH 9~10 时生物量逐渐降低。用 Tukey 法多重比较分析,在 pH 7~8 的病原菌生长量差异不显著,表明供试菌株最适宜生长 pH 为 7~8。

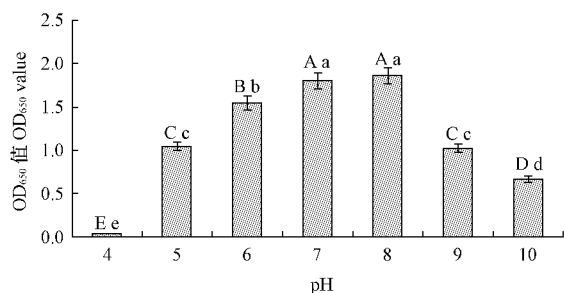


图 5 病原菌在不同 pH 下的生长情况

Fig. 5 Growth status of pathogen at different pH

2.5 病原菌的耐盐性比较

由图 6 可知,当氯化钠浓度在 0.0%~1.0%时,随盐度的增加,生物量增加,盐度为 1.0%时生物量达最大值;盐度在 1.5%~5.0%时,随盐度的增加,生物量逐渐减少;当盐度为 3.5%时,生物量明显降低,说明此浓度下病原菌生长受到明显的抑制,盐度为 4.0%~5.0%时,病原菌几乎不生长。用 Tukey 法进行多重比较分析,在 0.5%~2.5%盐度下,病原菌的生物量差异不显著,表明供试菌株适宜的生长盐度为 0.5%~2.5%,最适宜的盐度为 1.0%。

2.6 病原菌对不同抗生素的敏感性

由图 7 可知,在吸附有土霉素、庆大霉素、四环素、链霉素的滤纸片周围有较大的抑菌圈,在吸附红霉素、氨苄霉素的滤纸片周围没有抑菌圈,表明供试菌株对土霉素、庆大霉素、四环素、链霉素敏感,对红

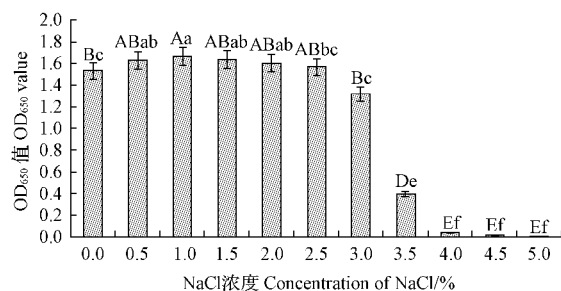
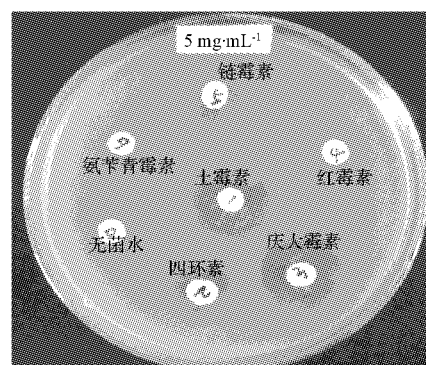


图 6 病原菌在不同盐度下生长情况

Fig. 6 Growth status of pathogen at different salinity



注:0、1、2、3、4、5、6 分别代表无菌水、土霉素、四环素、庆大霉素、红霉素、链霉素、氨苄青霉素。

Note: 0, sterile water (CK); 1, terramycin; 2, tetracycline; 3, gentamicin; 4, erythromycin; 5, streptomycin; 6, ampicillin.

图 7 病原菌对不同抗生素的敏感性

Fig. 7 Sensitivity of the pathogen to different antibiotics

霉素、氨苄霉素不敏感。

2.7 不同敏感抗生素的病原菌 MIC(最低抑制浓度)对病原菌的抑制作用

由表 1 可知,链霉素、四环素、庆大霉素和土霉素的最低抑制浓度 MIC 分别为 312.0、156.0、78.0、78.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 不同浓度及种类抗生素对病原菌的抑制作用

Table 1 Inhibition of different antibiotics at different concentration to the pathogen					mm
抗生素浓度 Concentration of antibiotics/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	链霉素 Streptomycin	四环素 Tetracycline	庆大霉素 Gentamicin	土霉素 Terramycin	
5 000.0	22.73	20.33	23.98	22.58	
2 500.0	19.78	17.51	21.27	19.52	
1 250.0	14.96	15.63	18.67	16.58	
625.0	11.04	13.65	15.54	13.56	
312.0	8.89	10.34	10.57	11.89	
156.0	0	9.56	9.07	10.03	
78.0	0	0	8.51	8.80	
39.0	0	0	0	0	
19.5	0	0	0	0	

3 结论与讨论

通过对病原菌的分离鉴定及部分生理特性的研究发现,平菇锈斑病的病原菌为托拉斯假单胞杆菌(*Pseudomonas tolaasii*),该病原菌适宜生长条件为最适生长的温度 21℃,pH 8,盐度 1.0%;对红霉素、氨苄青霉素不敏感,但对庆大霉素、土霉素、四环素、链霉素敏感,其中对链霉素、四环素、庆大霉素和土霉素的最低抑制浓度分别为 312.0、156.0、78.0、78.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

在生产栽培中,平菇锈斑病多发生在冬、春季,而在此时广西平菇栽培产区气温低,一般在 20℃以下,子实体生长变慢,代谢较弱,但是病原菌在 20℃左右,仍能快速繁殖生长,这与锈斑病在 18~20℃较易发生相吻合。病原菌在 21~27℃的条件下均能很快的繁殖,而且在 21℃繁殖最快,而大多数平菇在 25℃以上条件下子实体生长加快,代谢旺盛,不利于病原菌的定殖和繁殖;可见温度是影响平菇锈斑病发生的重要因素之一^[7]。

大多数平菇在 pH 6~8 时,菌丝均能较好生长,这与病原菌适宜的酸碱度相接近,所以通过调整培养料的酸碱度来防治培养料中的病原菌难度大。但是,锈斑病发生主要是在出菇期,表现在子实体上,而且锈斑病病原菌的传播通过水流、空气的概率较大,所以在生产中,当病害发生时,除应立即停止喷水,加大通风外,也可以通过提高环境的 pH,抑制病

原菌的生长,达到减轻或防治病害的效果,如在环境中喷 5%石灰水或漂白粉液^[8]。

病原菌的耐盐性比较强,而平菇耐盐性弱,因此,通过调整盐度来防治病原菌行不通。

利用病原菌对抗生素敏感的特性进行病害防治,在农业中应用广泛也取得了很好的效果。该研究得出平菇锈斑病病原菌对庆大霉素、土霉素、四环素、链霉素敏感,因此在生产中可以考虑利用这些抗生素进行该病害的防治^[8-9]。

参考文献

- [1] 孙婕,肖扬,边银丙.平菇褐斑病和软腐病发生规律初步调查[J].中国食用菌,2011,30(4):66,68.
- [2] 决超,杨国君,赵亚娟,等.抗黄斑病深色平菇品种筛选试验[J].北京农业,2013(30):127-128.
- [3] 刘新华,曹修才,张牧海,等.聊城市平菇黄斑病的发生与防控技术[J].农业科技通讯,2014(9):264-265.
- [4] 方中达.植物研究方法[M].北京:北京农业出版社,1998:181-182.
- [5] 金丹,李宝聚,石延霞,等.一种平菇褐斑病病原菌的鉴定[J].食用菌学报,2009,16(1):89-91.
- [6] 严悦.平菇对褐斑病的室内抗性分析及药剂防治[D].桂林:广西大学,2013.
- [7] 刘川,陈强,张金霞,等.平菇细菌性黄斑病发病因素分析[J].食用菌学报,2013(1):101-105.
- [8] 杨爱芸.食用菌病虫害综合防治技术[J].农业科技与信息,2012(3):33-35.
- [9] 努尔孜亚,郝敬喆,魏鹏,等.北疆地区食用菌细菌性褐斑病诊断与防治药剂筛选[J].新疆农业科学,2012,49(12):2234-2238.

Identification and Physiological Characteristics of Pathogeny Caused Rusty Spot Disease for *Pleurotus ostreatus*

CHEN Xuefeng, WU Xiaojian, WANG Canqin, WU Shengjin, WEI Shiyang

(Institute of Microbiology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract: *Pleurotus ostreatus* sporocarp naturally infected rusty spot disease that collected from Nanning, Guangxi was used as test material. The pathogen was isolated by tissue isolation and pathogenicity was tested following Koch's postulate; identification of the pathogen was conducted by ITS 16S rDNA molecular identification. The suitable growth temperature, pH levels and salinity were detected by testing the bacteria biomass. Sensitivity of antibiotics of the pathogen was detected by Haloes methods. The results showed that the pathogen infected the *Pleurotus ostreatus* was *Pseudomonas tolaasii*, and the optimal conditions for its growth were as follows, temperature 21—30℃; pH 7—8; salinity 0.5%—2.5%. Streptomycin, tetracycline, gentamicin and terramycin could inhibit growth of pathogen and the MIC was 312.0, 156.0, 78.0, 78.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The pathogen was not sensitive to erythromycin and ampicillin.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*; rusty spot disease; identification; physiological characteristics