DOI:10.11937/bfyy.201702036

四个托拉斯假单胞杆菌菌株对平菇CCEF-99的致病力测定

宋　爽[1,2]，刘　宇[1,2]，许　峰[1,2]，王守现[1,2]，牛玉蓉[1,2]

(1.北京市农林科学院 植物保护环境保护研究所，北京市食用菌工程技术研究中心，北京 100097；
2.农业部都市农业(北方)重点实验室，北京 100097)

摘　要：托拉斯假单胞杆菌(*Pseudomonas tolaasii*)是引起食用菌细菌性褐斑病的病原菌，该研究利用平皿对峙和子实体接种的方法，研究了4个不同托拉斯假单胞杆菌菌株对平菇CCEF-99菌丝体和子实体生长的影响，评价不同菌株的致病能力，为平菇品种抗病性鉴定提供备选鉴别菌株。结果表明：菌株JZB2120025的致病力最弱，病斑面积小，颜色呈淡黄色；菌株JCM21583的致病力最强，产生的病斑凹陷，颜色呈棕褐色，可作为平菇抗病性状检测的备选菌株。

关键词：托拉斯假单胞杆菌；细菌性褐斑病；致病力；平菇

中图分类号：S 435.673　**文献标识码**：B　**文章编号**：1001－0009(2017)02－0150－03

平菇(*Pleurotus ostreatus*)是中国广泛栽培的食用菌，具有很高的营养价值和经济效益，根据中国食用菌协会统计数据，2014年中国平菇产量位于所有食用菌品种第三位，达546万t。细菌性褐斑病(brown blotch disease)又被称为斑点病、锈斑病，黄斑病[1]，是在平菇栽培过程中危害较为严重的一种病害。细菌性褐斑病的病原菌为托拉斯假单胞杆菌(*Pseudomonas tolaasii*)，其产生的细胞外毒素-托拉斯毒素(tolaasin)可直接破坏平菇菌丝的细胞膜，使平菇菌盖表面产生黄褐色或深褐色的斑点[2]，使染病子实体的商品价值大大降低，严重影响平菇生产的经济效益。因此，了解托拉斯假单胞杆菌致病力状况，并利用强致病力菌株检测平菇各品种抗病性，对生产中平菇品种的选择和抗病育种均具有重要意义。该研究通过测定不同来源的细菌性褐斑病病原菌托拉斯假单胞杆菌对平菇CCEF-99菌丝体和子实体生长的影响，对其致病力作出评价，以期为今后平菇品种抗性鉴定提供备选菌株提供参考。

第一作者简介：宋爽(1987-)，女，硕士，研究实习员，现主要从事食用菌病虫害防控等研究工作。E-mail:songshuang1025@163.com.

责任作者：刘宇(1968-)，男，本科，研究员，现主要从事食用菌育种及栽培等研究工作。E-mail:ly6828@sina.com.

基金项目：国家食用菌产业技术体系资助项目(CARS-24)；北京市科技计划重大资助项目(D151100004315002)；国家支撑计划资助项目(2013BAD16B03)。

收稿日期：2016－10－08

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　供试菌株　4个托拉斯假单胞杆菌菌株：JCM21583购自日本微生物菌种保藏中心；JZB2120021、JZB2120022、JZB2120025分离自糙皮侧耳的子实体，经鉴定为托拉斯假单胞杆菌。平菇CCEF-99由北京市农林科学院植物保护环境保护研究所保藏。

1.1.2　培养基　LB液体培养基：胰蛋白胨10 g，酵母提取物5 g，NaCl 10 g，加蒸馏水定容至1 000 mL，121 ℃灭菌20 min，用于托拉斯假单胞杆菌的培养。综合PDA培养基：去皮马铃薯200 g熬汁，葡萄糖20 g，琼脂20 g，KH_2PO_4 3 g，$MgSO_4$ 1.5 g，蛋白胨5 g，维生素B_1 10 mg，加蒸馏水定容至1 000 mL，121 ℃灭菌20 min，用于平菇菌丝培养。

1.1.3　平菇栽培袋　棉籽壳48%，麸皮20%，玉米芯30%，石膏1%，石灰1%，用17 cm×35 cm聚乙烯袋，每袋装干料570 g，含水量60%，121 ℃灭菌180 min。

1.2　试验方法

1.2.1　病原菌菌悬液制备　在LB液体培养基中分别接入4株活化的托拉斯假单胞杆菌单菌落，25 ℃恒温震荡培养12 h。利用分光光度计在波长600 nm

条件下测定病原菌菌体密度,当OD值为0.8时得到浓度约为1×10^8 cfu·mL^{-1}的菌悬液。

1.2.2 平皿对峙试验 利用打孔器将活化的平菇CCEF-99菌丝体定量接种在PDA培养基平皿的左半边,置于25 ℃恒温培养箱中培养3 d后,紧挨菌丝生长边缘将培养好的病原菌菌悬液均匀涂布在平皿右半边区域内,继续置于25 ℃恒温培养箱中培养3 d,测定平皿中平菇菌丝的正常生长速度和与病原菌拮抗生长速度。每株病原菌设置3个重复,每个重复设3皿。

1.2.3 子实体接种试验 将适量平菇CCEF-99液体菌种接入栽培袋中,25 ℃发菌培养30 d左右。将发满菌的平菇CCEF-99菌袋移入日光温室进行出菇管理。当平菇子实体直径生长到1～2 cm时,人工接种病原菌菌悬液20 μL于子实体菌盖表面,空白对照用无菌水代替病原菌菌悬液,接种24 h后记录有无病斑产生。每株病原菌设置3个重复,每个重复各20个菌袋。

1.3 项目测定

平菇菌丝块定量接种在PDA培养基平皿后,菌丝恢复生长48 h,待右侧菌丝接触到病原菌时,在菌丝块左右边缘各划线作为生长起始线,测量2侧菌丝生长前段与起始线之间的距离,并记录培养天数,分别计算2侧菌丝生长速度。平皿左侧为正常生长速度,右侧为拮抗生长速度。抑制率(%)=(正常生长速度－拮抗生长速度)/正常生长速度×100。

1.4 数据分析

试验数据采用DPS 7.05统计软件进行分析,采用Duncan新复极差法分析4株病原菌对平菇菌丝生长抑制率及对子实体致病力的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同病原菌对平菇菌丝生长的影响

由表1可知,各病原菌在1×10^8 cfu·mL^{-1}菌液浓度下,平菇菌丝生长受到不同程度的抑制或阻碍。在0.01和0.05的检测水平下,不同病原菌菌株对平菇菌丝生长的抑制率具有显著差异。菌株JCM21583对平菇菌丝生长的抑制作用最强,与正常生长一侧速度相比,拮抗一侧菌丝生长速度明显下降,达到35.20%。

2.2 不同病原菌侵染平菇子实体的致病力

对不同托拉斯假单胞杆菌侵染平菇CCEF-99第1、2潮菇子实体的致病力进行了统计(表2),4株病原菌均可引起细菌性褐斑病的发生,其中菌株JCM21583致病力最强,接种该病原菌后,褐斑病发病率为60.27%,病斑呈棕褐色,凹陷于子实体菌盖内;菌株JZB2120025致病力最弱,发病率为8.42%,菌盖表面形成淡黄色病斑。接种无菌水作为对照的平菇子实体没有产生病斑,生长正常。

表1 不同托拉斯假单胞杆菌对平菇菌丝生长的抑制率

Table 1 Inhibition rate of different *P. tolaasii* strains on growth of *P. ostreatus* mycelium %

病原菌 Strain	重复Ⅰ Repeat Ⅰ	重复Ⅱ Repeat Ⅱ	重复Ⅲ Repeat Ⅲ	平均值 Mean
JCM21583	35.25	33.50	36.84	35.20aA
JZB2120022	27.33	26.81	23.11	25.75bB
JZB2120021	17.85	16.72	18.50	17.69cC
JZB2120025	8.26	9.83	8.92	9.00dD

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note:Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level, different capital letters indicate very significant difference at 0.01 level. The same below.

表2 不同托拉斯假单胞杆菌侵染平菇子实体的发病率

Table 2 Disease incidence of different *P. tolaasii* strains invading *P. ostreatus* fruit body %

病原菌 Strain	重复Ⅰ Repeat Ⅰ	重复Ⅱ Repeat Ⅱ	重复Ⅲ Repeat Ⅲ	平均值 Mean
JCM21583	51.16	64.27	65.38	60.27aA
JZB2120022	53.40	39.31	47.19	46.63bAB
JZB2120021	25.08	30.10	38.04	31.07cB
JZB2120025	8.25	6.62	10.38	8.42dC
对照 CK	0	0	0	—

进一步对CCEF-99第3、4潮菇子实体接种病原菌,JCM21583、JZB2120022、JZB2120021和JZB2120025对子实体的致病力分别达到91.8%、62.1%、65.2%和33.4%,而未接种病原菌的子实体也出现细菌性褐斑病的病斑,发病率在5%左右,表明在平菇出菇后期,其抗病能力明显下降。

3 讨论

TOLAAS[3]首次报道托拉斯假单胞杆菌引起双孢蘑菇细菌性褐斑病,随后在平菇、香菇、杏鲍菇、金针菇等多种食用菌生产中也发现了该病原菌引起的细菌性褐斑病,严重时发生率可以达80%以上[1]。对4株托拉斯假单胞杆菌的致病力分析发现,不同菌株的致病力差异较大,分离自芬兰双孢蘑菇的JCM21583的致病力强于3株分离自北京平菇生产基地的JZB2120021、JZB2120022、JZB2120025,这可能与病原菌受不同的寄主、营养条件、外界生态因素、本身遗传变异或次生代谢产物等的影响有关[4]。不

同病原菌对平菇菌丝生长的抑制率与其对子实体的致病力趋势大致相同,为室内检测病原菌的致病力提供了简便方法。

平菇 CCEF-99 因其转潮快、耐高温、产量高,被广大菇农接受和认可[5],但该品种在春秋季节较易感染细菌性褐斑病,且病症明显,严重时子实体通体发黄萎蔫,呈畸形腐烂之势。该研究中,在第 1、2 潮菇期间平菇菌丝茁壮生长,抵抗致病菌的能力较强;但随着子实体不断生长、采摘,抗病能力减弱,给致病菌提供了侵染机会,因而 3、4 潮菇感病较重,在强致病菌的作用下,发病率达到 90%以上。

国内学者通过对托拉斯假单胞杆菌致病性的研究,开展了食用菌细菌性褐斑病防治技术的研究。徐岩岩等[6]通过对托拉斯假单胞杆菌在平菇表层的增殖动态研究发现,致病菌达到 1×10^7 cfu·g^{-1}才会引发褐斑病;刘川等[7]研究了温度、湿度、培养料、菇潮等因素对于平菇细菌性褐斑病发病的影响;赵肖静等[8]利用褐斑病弱致病力菌株筛选得到一株抗病效果好的平菇诱抗菌株,诱导抗病效果为 66.73%。该研究开展了不同细菌性褐斑病病原菌托拉斯假单胞杆菌致病力的研究,在检测食用菌抗病能力或者抗病育种时,可选用致病力较强的 JCM21583 作为备选鉴别菌株。在食用菌栽培过程中也应加强对细菌性褐斑病的防控及田间管理,减缓病害的发展蔓延。

参考文献

[1] 张瑞颖,胡丹丹,左雪梅,等. 平菇和双孢蘑菇细菌性褐斑病研究进展[J]. 植物保护学报,2007,34(5):549-554.

[2] HUTCHISON M L,JOHNSTONE K. Evidence for the involvement of the surface active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of brown blotch disease symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology,1993,42(5):373-384.

[3] TOLAAS A G. A bacterial disease of cultivated mushrooms[J]. Phytopathology,1915(5):51-54.

[4] 赵鸣. 山东省主要棉区棉花黄萎病菌致病力分化及其生物学特性的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2010.

[5] 徐晖,梁瑞玲. 平菇 CCEF99 菌株特性与栽培要点[J]. 食用菌,2000(4):16-17.

[6] 徐岩岩,陈璐,李金萍,等. 平菇细菌性褐斑病病原菌 RT-PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 园艺学报,2013,40(1):169-178.

[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,2013,20(1):101-105.

[8] 赵肖静,石延霞,谢学文,等. 平菇细菌性褐斑病诱抗菌株筛选及诱抗效果[J]. 食用菌学报,2013,20(1):96-100.

Pathogenic Test of Four Different *Pseudomonas tolaasii* Strains to *Pleurotus ostreatus* CCEF-99

SONG Shuang[1,2],LIU Yu[1,2],XU Feng[1,2],WANG Shouxian[1,2],NIU Yurong[1,2]

(1. Institute of Plant and Environment Protection,Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Beijing Engineering Research Center for Edible Mushroom,Beijing 100097;2. Key Laboratory of Urban Agriculture (North),Ministry of Agriculture,Beijing 100097)

Abstract:Brown blotch disease,a serious mushroom disease,is usually caused by the bacterial pathogens of *Pseudomonas tolaasii*. In this study,the influence of four different *P. tolaasii* strains on the mycelium and fruit body growth of *Pleurotus ostreatus* CCEF-99 were tested to screen strains with strong pathogenicity and to provide backup strains for identifying resistance of mushroom varieties. The results showed that,the strain JCM21583 had the strongest pathogenic effect and could be used as identification strain to test the resistance ability of *P. ostreatus* against brown blotch disease.

Keywords:*Pseudomonas tolaasii*;brown blotch disease;pathogenicity;*Pleurotus ostreatus*