

真姬菇蛛网病生物防治新方法

张琪辉, 温志强

(福建农林大学菌物研究中心, 福州 350028)

摘要: 通过对比枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、链霉菌 (*Streptomycetaceae*) Js-1^T、哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) Tri.sp49 和绿色木霉 (*Trichoderma viride*) Tri.sp53 发酵液单独使用和混合使用对真姬菇蛛网病病原菌和真姬菇菌株的抑菌效果, 发现链霉菌 Js-1^T 发酵液对蛛网病病原真菌具有较强的抑制作用, 同时对真姬菇菌丝的抑制作用较小。此外, 还发现芽孢杆菌发酵液和木霉发酵液配合使用对蛛网病病原真菌的抑制率有明显提高, 表明这是一种十分具有潜力的生物防治新方法。

关键词: 微生物学; 链霉菌; 芽孢杆菌; 哈茨木霉; 生物防治; 蛛网病

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2015)19-2009-05

A new biological control of cobweb disease on *Hypsizygus marmoreus*

ZHANG Qihui, WEN Zhiqiang

(Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350028, China)

Abstract: In this study, we compare the inhibitory effects on pathogenic bacteria and cobweb disease on strains of *Hypsizygus marmoreus* of the single and mixed fermentation broth of *Bacillus subtilis*, *Streptomycetaceae* Js-1^T, *Trichoderma harzianum* Tri.sp49 and *Trichoderma viride* Tri.sp53. The results show the fermentation broth of *Streptomycetaceae* Js-1^T has strong inhibitory effect to the pathogen of cobweb disease, while smaller inhibitory effect on *H. marmoreus*. On the other hand, we also find mixed fermentation broth of *Bacillus* and *Trichoderma* have stronger inhibitory effect than the single fermentation, which provides a new and very promising biological control method.

Key words: microbiology; *Streptomycetaceae*; *Bacillus subtilis*; *Trichoderma harzianum*; biological control; cobweb disease

0 引言

真姬菇 [*Hypsizygus marmoreus* (Peck) H. E. Bigelow] 俗名玉蕈、斑玉蕈、白玉菇、蟹味菇, 外形美观、质地脆嫩、味道鲜美, 含有多种蛋白质、人体必需氨基酸和维生素, 高蛋白、低脂肪, 是一种名贵食用菌^[1]。20世纪80年代开始在我国进行商品化种植, 目前已成为国内第十大食用菌种植品种, 是国内食用菌工厂化栽培的主要品种之一^[2]。中国食用菌商务网调查结果显示, 2012年全国工厂化栽培真姬菇的日产量已达到167 t。

蛛网病是由 *Cladobotryum/Hypomyces* 属真菌侵染引起的食用菌病害, 已经在双孢蘑菇、金针菇等大规模工厂化种植的食用菌上造成了重大经济损失^[3~4]。2012年, 在福建某真姬菇产地发现一种病害, 经鉴定为蛛网病, 该病害导致真姬菇腐烂, 同时产生大量的孢子飘散在厂房中继续污染其他健康菇, 造成

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2013BAD16B03)

作者简介: 张琪辉 (1989—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 食用菌病害

通信联系人: 温志强, 教授, 主要研究方向: 食用菌病虫害. E-mail: 595154360@qq.com

了重大的经济损失, 对于该病害的防治成为亟待解决的问题。针对传统药物防治方法带来的生态环境问题和农药残留问题, 生物防治是一种高效无公害的新防治方法。

芽孢杆菌类细菌、木霉菌、放线菌是目前研究最多、应用最广的生防用菌。美国已有4株芽孢杆菌生防菌得到了美国环保署商品化或有限商品化生产应用许可^[5]; 苏云金芽孢杆菌是应用最为广泛的一类生防杀菌剂, 吴小平等^[6]发现枯草芽孢杆菌 BS-2 会分泌多种抗菌蛋白质, 其对疣孢霉、脉孢菌都有较强的抑制作用, 而对食用菌的抑制作用极小, 木霉对多种病原真菌有抑制作用。古显新^[7]研究结果显示, 绿霉浸出液在食用菌袋料栽培中防霉效果优于高锰酸钾和多菌灵。RUANO-ROSA 等^[8]研究表明, 链霉菌 Js-1^T 发酵液对有害疣孢霉、龙眼拟茎点霉病原菌、牡丹灰葡萄孢病菌等均有较强的抑制作用。胡清秀等^[9]研究发现, 芽孢杆菌和木霉培养液配合使用对根腐病的抑制作用比单独使用更加强。研究通过对比芽孢杆菌、链霉菌和木霉发酵液单独使用和混合使用的抑菌效率, 以期发现对蛛网病更为有效的生防方法, 为生产上对该病害的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株与来源

病原菌分离自真姬菇罹病子实体, 编号 H.a0001, 真姬菇菌种为工厂栽培种, 编号 Hy.m0040; 枯草芽孢杆菌, 链霉菌 Js-1^T, 哈茨木霉编号 Tri.sp49, 绿色木霉编号 Tri.sp53, 以上菌株均保藏于福建农林大学菌物研究中心。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖培养基(简记为 PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 值自然; 马铃薯葡萄糖液体培养基(简记为 PDB): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 水 1 000 mL, pH 值自然。马铃薯葡萄糖液体培养基(简记为 PD): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 值自然。

1.2 方法

1.2.1 生防菌对峙试验

将活化后的哈茨木霉 Tri.sp49 和绿色木霉 Tri.sp53 接种在 PDA 平板上, 在距离接种块 2 cm 的圆线上分别接种链霉菌 Js-1^T 和枯草芽孢杆菌, 定期观察 2 种菌间的拮抗情况。

1.2.2 生防菌发酵液对病害菌的抑制试验

将哈茨木霉 Tri.sp49、绿色木霉 Tri.sp53 和链霉菌 Js-1^T 接种在装有 100 mL PDB 培养基的三角瓶中, 25℃ 摇床中振荡培养 1 周; 枯草芽孢杆菌接种在装有 100 mL PD 培养基的三角瓶中, 37℃ 摇床振荡培养 2 d; 将培养好的各菌株用四层纱布过滤除去菌体, 再用 10 000 r/min 离心 10 min 进一步除去残留菌体得到发酵液, 在超净工作台用 0.22 μm 无菌滤头过滤发酵液得到无菌的发酵液; 按表 1 中配比添加无菌发酵液到冷却至 50℃ 左右的 PDA 培养基中, 摇匀后倒平板, 将活化后的病害菌 H.a0001 接种在平板上(为减少误差, 菌块均用 6 mm 的打孔器制作), 在 22℃ 恒温培养箱中倒置培养, 所有处理均设置 4 个重复, 3 d 后采用划“十”字法测定菌落直径, 计算生长速度和抑制率。

$$\text{菌丝生长速度 (mm}\cdot\text{d}^{-1}) = (\text{菌丝生长直径平均值} - 6) / (2 \times 3)$$

$$\text{菌丝生长相对抑制率} = (\text{对照菌丝生长速度} - \text{处理菌丝生长速度}) / \text{对照菌丝生长速度} \times 100\%$$

表 1 发酵液配比

Tab. 1 Ratio of fermentation broth

成分	对照	链霉菌 Js-1 ^T	枯草芽孢杆菌	Tri.sp53	Tri.sp49	Js-1 ^T + Tri.sp53	Js-1 ^T + Tri.sp49	枯草芽孢杆菌 + Tri.sp53	枯草芽孢杆菌 + Tri.sp49
H ₂ O	2								
链霉菌 Js-1 ^T		2				1	1		
枯草芽孢杆菌			2					1	1
Tri.sp53				2		1		1	
Tri.sp49					2		1		1

1.2.3 生防菌发酵液对金黄菌寄生的抑制试验

生防菌发酵液对真姬菇菌丝的抑制试验方法同 1.2.2，22℃ 恒温培养 12 d 后进行测量。

2 结果与分析

2.1 对峙结果

体外对峙试验结果表明，哈茨木霉 Tri.sp49 和绿色木霉 Tri.sp53 对链霉菌 Js-1^T 均有较强的抑制作用，且绿色木霉 Tri.sp53 对链霉菌的抑制作用比哈茨木霉 Tri.sp49 更大；哈茨木霉 Tri.sp49 和绿色木霉 Tri.sp53 都能与枯草芽孢杆菌共生长（如图 1 所示）。

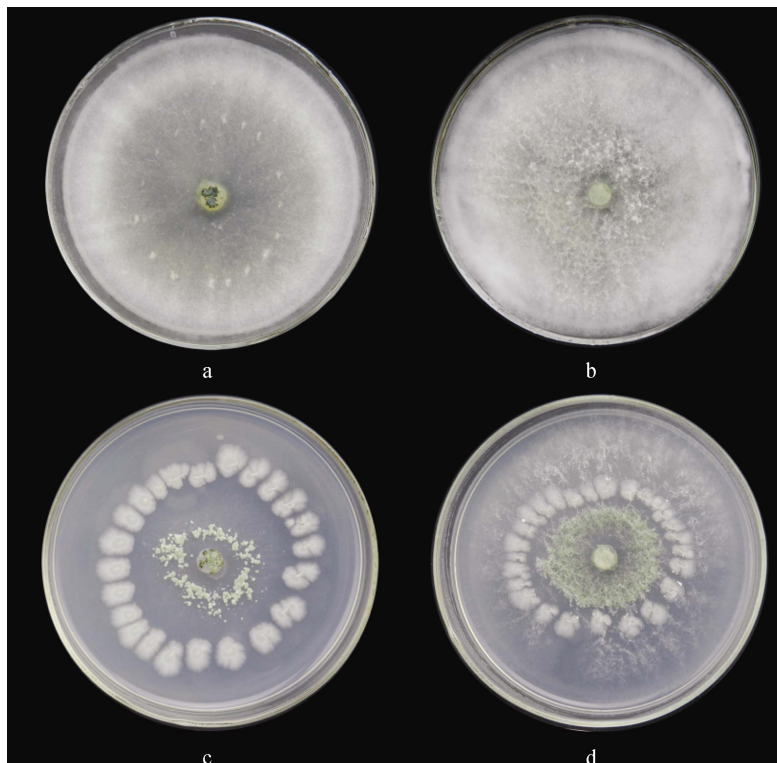


图 1 对峙试验

Fig. 1 Dual-culture experiments

a—Js-1^T+Tri.sp49; b—Js-1^T+Tri.sp53; c—枯草芽孢杆菌+Tri.sp49; d—枯草芽孢杆菌+Tri.sp53

a-Js-1^T+Tri.sp49; b-Js-1^T+Tri.sp53; c-*B. subtilis*+Tri.sp49; d-*B. subtilis*+Tri.sp53

2.2 发酵液抑菌试验结果

发酵液的抑菌试验结果如表2所示, 单独的链霉菌 Js-1^T、枯草芽孢杆菌、哈茨木霉 Tri.sp49 和绿色木霉 Tri.sp53 的发酵液对病害菌 H.a0001 的抑制率分别为 (27.60±0.75)%, (1.24±0.55)%, (1.98±0.63)% 和 (4.46±0.52)%, 而对真姬菇 Hy.m0040 的抑制率为 (13.33±0.96)%, (0.95±0.82)%, (0.32±0.58)% 和 (0.32±0.58)%; 链霉菌 Js-1^T 发酵液分别与哈茨木霉 Tri.sp49 和绿色木霉 Tri.sp53 的发酵液按 1:1 混合后对 H.a0001 的抑制率分别为 (19.43±0.75)% 和 (13.86±0.89)%, 而对真姬菇 Hy.m0040 的抑制率为 (31.11±0.50)% 和 (30.16±0.82)%; 枯草芽孢杆菌发酵液分别与哈茨木霉 Tri.sp49 和绿色木霉 Tri.sp53 的发酵液按 1:1 混合后对 H.a0001 的抑制率分别为 (6.19±0.75)% 和 (5.32±0.96)%, 而对真姬菇 Hy.m0040 的抑制率为 (1.90±0.50)% 和 (1.59±0.58)%。

表2 发酵液抑菌效果

Tab. 2 Antibacterial activity of the fermentation broth

发酵液	抑制率/%	
	H.a0001	Hy.m0040
链霉菌 Js-1 ^T	27.60±0.75	13.33±0.96
Js-1 ^T +Tri.sp53	19.43±0.75	31.11±0.50
Js-1 ^T +Tri.sp49	13.86±0.89	30.16±0.82
枯草芽孢杆菌	1.24±0.55	0.95±0.82
Tri.sp49	1.98±0.63	0.32±0.58
Tri.sp53	4.46±0.52	0.32±0.58
枯草芽孢杆菌+Tri.sp53	5.32±0.96	1.59±0.58
枯草芽孢杆菌+Tri.sp49	6.19±0.75	1.90±0.50

3 讨论与结论

食用菌病虫害是影响食用菌产量和质量的重要因素之一。食用菌出菇环境多为阴暗、潮湿的环境, 也适合病原菌的生长和病害的发生。由于食用菌及其上发生的病原真菌同为真菌, 所以食用菌病害一旦发生, 便很难控制^[9]。生物防治是一种高效无公害的防治手段。

研究对枯草芽孢杆菌、链霉菌 Js-1^T、哈茨木霉 Tri.sp49 和绿色木霉 Tri.sp53 进行对峙试验和发酵液的抑菌试验, 结果显示: 单独使用链霉菌的发酵液具有最强的抑菌效果, 绿色木霉、哈茨木霉、枯草芽孢杆菌发酵液的抑菌效果依次降低。链霉菌发酵液分别与哈茨木霉、绿色木霉发酵液混合使用时抑菌率均有所下降, 这与对峙结果中木霉能够抑制链霉菌生长的结果一致; 单独使用时抑菌效果较低的芽孢杆菌和木霉混合使用后其抑菌效果均有了显著提高, 这与对峙结果中芽孢杆菌和木霉能够共存是一致的。

链霉菌 Js-1^T 发酵液对蛛网病的病原菌具有较强的抑制效果, 同时本试验提供了一种具有新潜力的生物学防治方法, 即可共存的杆菌类细菌和木霉属真菌间的相互协作可以达到更强的抑菌效果, 为真姬菇栽培过程中防治蛛网病提供了新的思路。

[参考文献] (References)

- [1] 王耀松, 邢增涛, 冯志勇, 等. 真姬菇营养成分的测定与分析[J]. 菌物研究, 2006, 4(4): 33-37.
WANG Y S, XING Z T, FENG Z Y, et al. Determination and analysis of major nutritional components in *Hypsizygus marmoreus* fruitbodies[J]. Journal of Fungal Research, 2006, 4(4): 33-37. (in Chinese)
- [2] 施肖堃, 曾辉. 中国真姬菇产业的发展 and 展望[J]. 福建轻纺, 2012, 8(8): 25-28.
SHI X K, ZENG H. The development and prospect of industry Chinese *Hypsizygus marmoreus*[J]. The Light and Textile Industries of Fujian, 2012, 8(8): 25-28. (in Chinese)
- [3] BACK G G, LEE C Y, SEO G S, et al. Characterization of species of *Cladobotryum* which cause cobweb disease in edible mushrooms grown in Korea[J]. Mycobiology, 2012, 40(3): 189-194.
- [4] BACK G G, LEE C Y, SEO G S, et al. First occurrence of cobweb disease on *Hypsizygus marmoreus* caused by *Cladobotryum varium* in Korea[J]. Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University, 2012, 57(2): 373-377.

- [5] 叶晶晶, 曹宁宁, 吴建梅, 等. 生防芽孢杆菌的应用研究进展[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2014, 42 (8): 185-190.
YE J J, CAO N N, WU J M, et al. Progress in application of *Bacillus*[J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2014, 42(8): 185-190. (in Chinese)
- [6] 吴小平, 彭建升, 谢宝贵, 等. 食用菌污染菌脉孢菌的生物防治[J]. 中国食用菌, 2009, 28 (2): 51-53, 62.
WU X P, PENG J S, XIE B G, et al. Biological control of *Neurospora* species from edible fungi[J]. Edible Fungi of China, 2009, 28(2): 51-53, 62. (in Chinese)
- [7] 古显新. 食用菌病虫害的生态防治和药物防治探讨[J]. 广东科技, 2013 (12): 178-179.
GU X X. Study on ecological control and drug control of edible fungus diseases and insect pests[J]. GD Science & Technology, 2013(12): 178-179. (in Chinese)
- [8] RUANO-ROSA D, CAZORLA F M, BONILLA N, et al. Biological control of avocado white root rot with combined applications of *Trichoderma* spp. and rhizobacteria[J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 138(4): 751-762.
- [9] 胡清秀, 宋金娣, 管道平. 食用菌病虫害危害分析与防治关键控制点[J]. 中国农学通报, 2008, 24 (12): 401-406.
HU Q X, SONG J D, GUAN D P. Hazard analysis and critical control point of edible fungi diseases and insect pests[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(12): 401-406. (in Chinese)