

华南草菇褐腐病及其病原细菌 的初步鉴定

刘坚真 罗吟珍 陈月辉 袁永生 范怀忠

(植保系)

提 要

1985年从感染褐腐病的草菇 (*Volvariella volvacea*) 子实体中分离出一种病原细菌。经试验测定, 此菌能侵入菌丝细胞内抑制草菇菌丝体生长, 使之变黄甚至腐烂, 子实体感染后黄褐色至黑褐色, 然后萎缩腐烂。

根据此菌的形态、培养特征及生理生化反应、血清学试验结果, 初步认为应归属于黄单胞菌属 (*Xanthomonas, sp.*)。

关键词 草菇; 褐腐; 黄单胞菌

引 言

草菇原产于我国, 后传入东南亚各国, 至今东南亚国家仍有“中国菇”之称。虽历经200多年, 但由于病害严重发生, 目前我国草菇生产仍极不稳定。据调查, 广东、福建、广西等省往往只收一潮菇 (“潮”是指较为明显的一段子实体收获期) 在第二潮、三潮, 病害就接连发生。原基期及小钮扣期子实体感病后转黄褐色至棕褐色, 逐渐萎缩腐烂; 钮扣期子实体也常呈现黄褐色而停止生长, 严重影响草菇质量和产量, 有的地方甚至颗粒无收。

在蘑菇上早在1919年国外已报道有由托拉氏假单胞菌 (*Pseudomonas tolaasii*) 引起的双孢蘑菇细菌性褐斑病^[1], 近年来又报道了一种假单胞菌 (*Ps. sp. GBO*) 引起的新病害^[2]。在国内又报道了由黄单胞菌引起的蘑菇新病害^[3], 但草菇的细菌性病害至今国内外未见报道。我们从1985年7月起进行了本研究工作, 从病菇中分离出一种细菌, 并进行了初步鉴定。

*本试验工作承蒙曾宪铭、吴国信、赖文美、何汉生、高乔婉等老师指导帮助, 杨阳火、章潜才、吴世盘老师协助拍照, 谨此致谢。

1988年2月4日收稿

材 料 和 方 法

(一) 病原细菌的分离

1985年7月在我校草菇栽培地采得变褐色实体,用常规法^[2]在马铃薯综合培养基上经多次分离、纯化、回接,得出纯病原细菌。

(二) 致病性的测定

1. 平皿拮抗试验:采用分离菌与培养基混合倒平板后,在平板中央接入草菇菌种的方法和培养基平板中央先接入草菇菌种,后用分离菌在草菇接种点外围划直径3 cm左右的接种圈。并与不接分离菌的作对照。

2. 平皿回接试验:在平皿中培养草菇菌落直径达3~4 cm时,采用直接涂分离菌液或用接种针钩割菌丝体后加分离菌液进行接种试验,同时用接无菌水作对照。

3. 三角瓶液体培养液中接入草菇菌丝的回接试验:在三角瓶液体培养液中接入草菇菌丝体,四天后当草菇菌丝体长成“白木耳”状时接入分离菌,并以不接种或接入番茄青枯病菌(*Pseudomonas solanacearum*)作对照。

4. 子实体回接试验:分别在草菇子实体原基期、小钮扣期、钮扣期用针刺法,接入分离菌悬浮液,并用接入无菌水作对照。

(三) 病原菌的形态、培养性状、生理生化反应和血清学试验

用常规法^{[1][2][4][5]}作革兰氏染色、鞭毛染色、荚膜染色。分别采用肉汁胨马铃薯蔗糖培养基、马铃薯葡萄糖综合培养基、酵母膏碳酸钙培养基(YDC)置30°C下培养以观察培养特性。

用常规法^{[1][2][4][5]}作葡萄糖发酵、氧化酶、过氧化氢酶、明胶液化、硫化氢产生、糖产酸、硝酸还原和淀粉水解等试验,并用番茄青枯病菌作对照。

用常规法^[2]以分离菌制备的抗血清为抗体,分别与分离菌、番茄青枯病菌、水稻白叶枯病菌为抗原,及用番茄青枯病菌的抗血清为抗体分别与分离菌、番茄青枯病菌为抗原作血清学的玻片凝集反应和琼脂扩散试验。

试 验 结 果

(一) 致病性

在平皿拮抗试验中,把草菇菌丝体接入混合病原细菌的培养基中,或在平皿中央接入草菇菌丝体,然后在外围接入分离菌,结果草菇菌丝体基本不生长,而对照在三天后菌落直径达9 cm(图版—1,2)

在平皿回接试验中,用分离菌悬浮液直接接种在草菇菌落中,草菇菌丝体约四分之一生势差,变褐色,而对照生长正常。用接种针钩割菌丝体后接菌液的其菌丝体均表现为

生长受抑制、变黄色、不能继续生长。对照的菌丝体第二天伤口愈合、恢复正常生长。

在三角瓶液体回接试验中接分离菌后三天菌丝体开始溶解, 培养液转黄褐色, 混浊; 四天后“白木耳”状菌块基本被溶解。镜检见菌丝体内有大量活动的细菌(图版-4)对照的菌丝体生长正常, 呈“白木耳”状, 培养液澄清, 镜检菌丝体内无细菌。接入番茄青枯病菌的菌丝体在初期有少量溶解, 培养液变混浊, 颜色基本不变, 后转入正常生长, 镜检菌丝体内无细菌。

在子实体回接试验中, 原基期子实体在回接后二至三天内转黄褐色至棕褐色, 后萎缩消失, 对照生长正常。小纽扣期子实体在回接后二至三天内接种部位变褐色, 四、五天后变黑而萎缩, 七天后腐烂消失, 对照生长正常(图版-5)在纽扣期回接的, 接种部位变褐色, 菇体不再长大, 渐渐萎缩, 或菇体仍继续长大, 但接种部位变褐色, 呈凹陷斑, 对照生长正常。

(二) 形态、生理生化反应

此病原细菌(表 I) 两端钝圆、直杆状、大小为 $0.49\sim 0.91\times 1.48\sim 2.94\mu$ 单根极生鞭毛(图版-3)、无荚膜、革兰氏染色阴性在马铃薯葡萄糖综合培养基上24小时菌落由黄

表 1 草菇褐腐病原细菌与草莓黄单胞特征比较

	草莓黄单胞菌	草菇褐腐病菌	番茄青枯病菌
菌体形态	杆状	杆状	杆状
鞭毛	一根极生	一根极生	1~4根极生
革兰氏染色反应	-	-	-
好气性或厌气性	好气	好气	好气
呼吸类型	呼吸型	呼吸型	呼吸型
氧化酶	-	-	+
过氧化氢酶	+	+	+
葡萄糖营养洋菜上	粘液生长	粘液生长	
粘液生长	+	+	-
明胶液化	-	-	-
从旦白胨产生硫化氢	-	-	-
产阿拉伯糖	+	+	+
产葡萄糖	-	-	+
产纤维二糖		+	-
甘露醇	+		
甘露糖	黄色	黄→灰褐→黑褐	白色
YDC培养基			

+示阳性反应 -示阴性反应

白转土黄色, 粘液、状48小时后浅红至褐色, 圆形稍凸, 在酵母膏碳酸钙(YDC)培养基中24小时菌落黄色、光滑, 稍凸, 48小时后菌落中心开始呈灰褐色72小时后菌落灰黑色, 且色素扩散至培养基中。在马铃薯蔗糖培养基中24小时菌苔白色有黄到蓝色水溶性色素。

葡萄糖氧化发酵试验结果为好气呼吸菌, 代谢类型为呼吸型, 过氧化氢酶阳性, 氧化酶阴性, 淀粉不水解, 不产生硫化氢, 利用葡萄糖、甘露醇产酸; 纤维二糖、阿拉伯糖不产酸。

对照的番茄青枯病菌在马铃薯葡萄糖综合培养基、酵母膏碳酸钙培养基(YDC)、马铃薯蔗糖培养基菌落均为白色。在葡萄糖氧化发酵试验中为好气呼吸, 代谢类型为呼吸型, 过氧化氢酶阳性, 氧化酶阳性, 淀粉不水解, 不产生硫化氢, 利用葡萄糖, 纤维二糖产酸; 阿拉伯糖甘露醇不产酸。

(三) 血清学试验结果

初步试验本病原菌的抗血清与水稻白叶枯病黄单胞菌在琼脂扩散试验中起阳性反应, 出现一条沉淀带, 而对照的本病原菌抗血清与本病菌则起玻片凝集反应, 在琼脂扩散试验中有二条共同沉淀带。但本菌的抗血清与番茄青枯病菌既无凝集反应, 也无琼脂扩散沉淀带。同样番茄青枯病菌的抗血清与本分离菌在凝集反应和琼脂扩散试验中起阴性反应。

讨 论

本研究的草菇病原细菌是经多次分离、纯化和回接试验成功, 并再分离得到相同的病原细菌, 已完成了柯赫氏定律要求, 因此可以确证本分离菌为此病原细菌。

对于草菇褐腐病病原细菌的归属问题, 据试验结果和黄单胞菌属有关文献^[1]进行比较(表1), 它们在菌体形态、鞭毛数目、革兰氏染色反应、呼吸、代谢、YDC培养基产生黄色色素, 及生理生化反应等方面的特性基本相同, 在血清学试验中本病原菌的抗血清又与水稻白叶枯病黄单胞菌有血清学阳性反应, 而与番茄青枯病原假单胞菌无血清学关系, 因此初步认为草菇褐腐病原细菌应归属黄单胞菌属。

此菌的种的鉴定工作在进行中。

引用文献

- [1] 中国科学院微生物研究所. 一般细菌常用鉴定法. 北京: 科学出版社, 1978: 111~153
- [2] 方中达. 植病研究法. 北京: 农业出版社, 1979: 163~169 271~272
- [3] 陆荣君, 孔祥君. 食用菌. 1984: 6 26~27
- [4] 斯克尔曼, V.B.D. 蔡妙英译. 细菌属的鉴定指导. 北京: 科学出版社1978: 147~149
- [5] 斯沙亚达 N.W.S. 张克勤译, 植物病原细菌鉴定实验指南. 贵州: 人民出版社
1986: 5, 28

- [6] Holt, J.G, The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th, 1977: 28-83
- [7] Paine, S.G, Annal of Applied biology 1919 5:206-219
- [8] Wong W. C.et al. Journal of Appiled Bacteriology, 1982; 52; 43-48

IDENTIFICATION OF A PATHOGENIC BACTERIUM CAUSING BROWN
ROT OF STRAW MUSHROOM IN SOUTH CHINA

Liu Jianzhen Luo Yinzhen Chen Yuehui Yuan Yongsheng Faan Hwei-chung

(Department of Plant Protection)

ABSTRACT

A brown rot of straw mushroom (*Volvariella volvacea*) occurred commonly and caused serious damage in Guangdong province, Fujian province and Guangxi Autonomous Region. A pathogenic bacterium was isolated in this laboratory in 1985. Inoculation tests showed that the infected mycelium of the fungus stopped growing first and then rotted away, and the fruiting bodies turned yellowish brown to dark brown in color, then shrank in size and finally also rotted away.

Based on the bacterium morphology, cultural characteristics, results of biochemical tests and serological test, the pathogenic bacterium was considered to be a *Xanthomonas* sp. Further study on the identification of the species is in progress.

key words: *Volvariella volvacea*, brown rot, *Xanthomonas* sp.

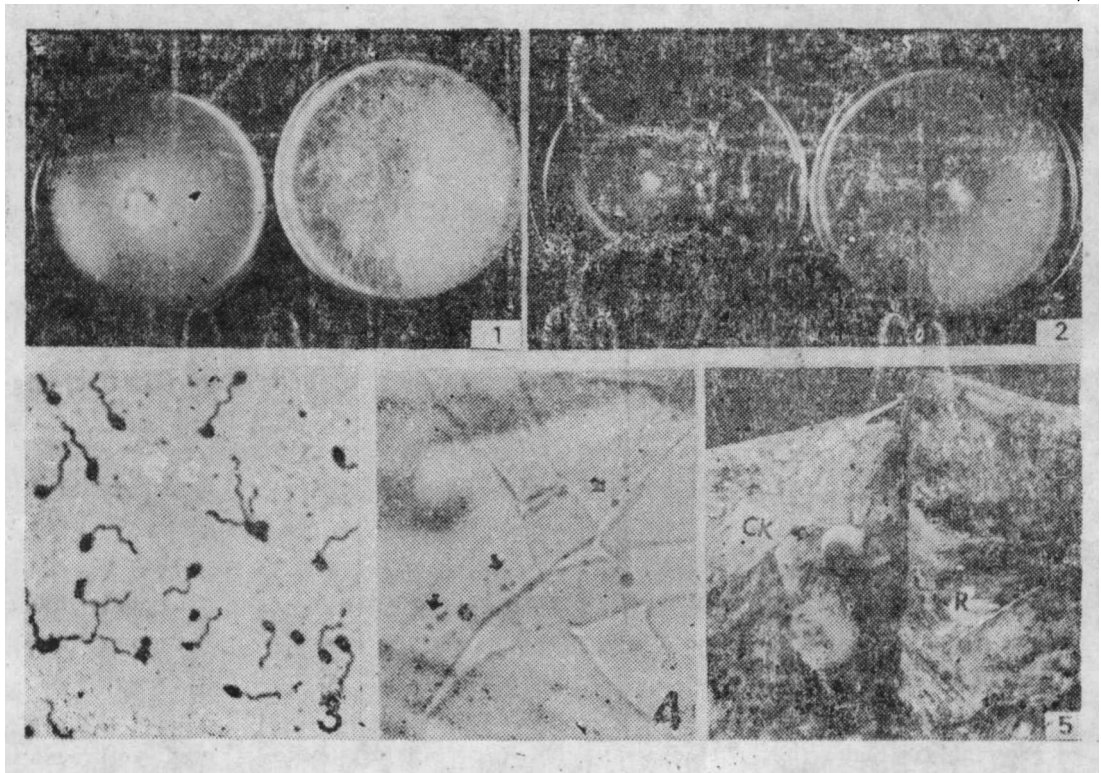


图 版

1. 平皿拮抗试验, 左图对照, 右图接入分离菌。(×0.4)
2. 平皿拮抗试验, 左图对照, 右图接入分离菌。(×0.4)
3. 示菌体及单根极生鞭毛。(×1500)
4. 菌丝在接种后含有病原细菌图示正在运动的细菌。(×1210)
5. 两个小纽扣期子实体回接后萎缩, 见图R示, CK为对照。(×0.25)