

摘要

羊肚菌是世界公认的稀有药用食用菌，目前羊肚菌人工种植业蓬勃发展，但由于种植技术的限制，仍无法实现可控的室内栽培，这导致羊肚菌微生物病害时常发生。关于羊肚菌病害病原菌的鉴定曾被多次报道，但还未见较为完整的致病机制探索。本论文对羊肚菌枯萎病病原菌及其病原学进行了系统研究，明确了病原菌种类及其病程特征，探讨了病原菌对羊肚菌的主要致病机制，为防控羊肚菌病害提供了理论依据。主要结果如下。

(1) 探索了羊肚菌枯萎病发生情况及其病原菌种类。本实验室在前期分离纯化了一株羊肚菌枯萎病病原菌，但还未对其进行准确的种属鉴定，本论文通过形态学鉴定及分子生物学鉴定，将其鉴定为棕榈拟盘多毛孢。该病原菌引起的羊肚菌病害常发生在羊肚菌采收期，主要在 2-4 月，此时温度较高可达 20℃ 以上，高温、高湿、空气滞留会加重该病害的爆发。该病菌对羊肚菌的致病力较弱，当其分生孢子浓度达到 1×10^4 个/mL 时才可对羊肚菌菌丝生长造成影响，当其分生孢子浓度达到 1×10^3 个/mL 时可导致羊肚菌子囊果患病。

(2) 首次观察了羊肚菌枯萎病的发病进程。通过形态观察、石蜡组织切片技术及显微技术观察了羊肚菌枯萎病发病过程中的组织形态病变。研究发现该病菌主要定殖于羊肚菌菌盖上，前期菌丝延羊肚菌纵褶和横褶蔓延，形成羽毛状病斑。后逐渐向外、向内深入，形成致密的白色绒毛状病斑，严重时可导致羊肚菌菌肉穿孔。石蜡组织形态观察显示，病原菌从外侧包裹羊肚菌菌肉，分泌细胞壁降解酶分解宿主细胞壁，导致宿主组织细胞破碎，营养物质外流，组织膨胀，组织间出现空洞；病原菌利用宿主组织外泄营养物质生长扩展，菌丝不断向宿主组织内部及四周扩散，最终致使羊肚菌组织萎缩。

(3) 研究了该病原菌对羊肚菌菌丝体的损伤。在病原菌与羊肚菌的共培养试验中，病原菌菌丝可形成“指状”结构，黏附于羊肚菌菌丝上，还可攀附缠绕羊肚菌菌丝，导致其缢缩枯萎。除此之外，在羊肚菌栽培时接种该病原菌还可导致羊肚菌产量显著下降。

(4) 探索了该病原菌次生代谢产物对羊肚菌菌丝生长的抑制作用。在病原菌与羊肚菌的对峙培养中，两菌之间没有产生抑菌带，但能观察到明显的拮抗线和棕色色素沉积，并在培养后期发现羊肚菌气生菌丝受到影响。该病原菌 PD 培养基发酵滤液几乎不影响羊肚菌菌丝生长，挥发性物质可抑制羊肚菌菌丝生长，导致其菌丝稀疏、气生菌丝羸弱。在 PD 培养基中该病原菌不产生几丁质酶和 β -1, 3 葡聚糖酶，产生较低酶活的中性蛋白酶。在羊肚菌罹病组织中可产生较大酶活的 β -1, 3 葡聚糖酶、中性蛋白酶和几丁质酶。

(5) 探索了该病原菌对羊肚菌内营养物质的利用情况，发现该病原菌分生孢子可充分利用羊肚菌浸提液中的营养物质萌发生长。前 36h 对蛋白质的需求较少而对可溶性糖的利用较多。可利用羊肚菌浸提液中多种氨基酸，并可产生半胱氨酸和酪氨酸。

关键词：羊肚菌；棕榈拟盘多毛孢；病原学；致病机制

目 录

摘要	V
Abstract	VII
第 1 章 前言	1
1.1 羊肚菌简介	1
1.1.1 羊肚菌科研价值及经济价值	1
1.1.2 羊肚菌栽培	2
1.1.3 羊肚菌生活史	2
1.2 羊肚菌病虫害	3
1.2.1 羊肚菌虫害	3
1.2.2 羊肚菌病害	3
1.2.3 羊肚菌生理性病害	4
1.2.4 羊肚菌病害的防治	4
1.3 拟盘多毛孢研究现状	5
1.3.1 拟盘多毛孢分类	5
1.3.2 拟盘多毛孢引起的病害	5
1.4 病原真菌致病机制研究现状	6
1.4.1 菌丝机械作用	6
1.4.2 毒素作用	7
1.4.3 细胞壁降解酶的作用	8
1.5 论文研究的目的及意义	8
1.6 技术路线	8

第 2 章 拟盘多毛孢引起的羊肚菌病害病原学研究	9
2.1 试验材料.....	9
2.1.1 供试菌株.....	9
2.1.2 试验试剂.....	9
2.1.3 试验仪器.....	9
2.2 试验方法.....	10
2.2.1 病害发生情况调查.....	10
2.2.2 病原菌种属鉴定.....	10
2.2.3 病原菌致病力检测.....	11
2.2.4 患病羊肚菌子实体疾病发展进程研究.....	11
2.3 统计及数据处理.....	12
2.4 结果与分析.....	12
2.4.1 病害发生情况调查.....	12
2.4.2 病原菌种属鉴定.....	13
2.4.3 病原菌致病力检测.....	15
2.4.4 患病羊肚菌子实体疾病发展进程.....	16
2.5 小结与讨论.....	17
第 3 章 棕榈拟盘多毛孢侵染羊肚菌致病机理探究	19
3.1 试验材料.....	19
3.1.1 供试菌株.....	19
3.1.2 试验试剂及耗材.....	19
3.1.3 试验仪器.....	19
3.2 试验方法.....	20

3.2.1 病原菌对羊肚菌菌丝体的损伤	20
3.2.2 病原菌对羊肚菌产量的影响	20
3.2.3 病原菌次生代谢产物的抑制作用	21
3.2.4 病原菌产细胞壁降解酶能力	21
3.2.5 患病羊肚菌组织细胞相对活性检测	22
3.2.6 病原菌对羊肚菌内营养物质的利用情况	22
3.3 统计及数据处理	23
3.4 结果与分析	23
3.4.1 病原菌对羊肚菌菌丝体的损伤	23
3.4.2 病原菌影响羊肚菌产量	24
3.4.3 病原菌次生代谢产物的抑制作用	25
3.4.4 病原菌产细胞壁降解酶能力	26
3.4.5 患病羊肚菌组织细胞相对活性	27
3.4.6 病原菌利用羊肚菌内营养物质情况	28
3.5 小结与讨论	28
第 4 章 结论与展望	31
4.1 鉴定了羊肚菌枯萎病病原菌种类	31
4.2 探索了棕榈拟盘多毛孢对羊肚菌的致病力及其病害发生情况	31
4.3 阐明了棕榈拟盘多毛孢对羊肚菌的主要侵染过程	31
4.4 揭示棕榈拟盘多毛孢对羊肚菌的主要致病机制	31
4.5 不足与展望	32
参考文献	33
附录	42

Abstract

Morchella is a rare medicinal edible fungus recognized in the world. At present, the artificial cultivation of morel is booming. However, due to the limitation of planting technology, it is still unable to achieve controllable indoor cultivation, which leads to frequent occurrence of morel microbial diseases. The identification of the pathogen of morel disease has been reported many times, but there is no relatively complete exploration of the pathogen mechanism. This paper conducted a systematic study on the pathogen of *Morchella* wilt and its etiology, clarified the types of pathogens and their disease course characteristics, and discussed the main pathogenic mechanism of pathogen to *Morchella*, which providing a theory for the prevention and control of *Morchella* diseases. The main results are as follows.

(1) The pathogenic environment of wilt of *Morchella* and the species of its pathogen were explored. A pathogen of *Morchella* wilt was isolated and purified in our laboratory in the early stage, but it has not been identified accurately. In this paper, it was identified as *Pestalotiopsis trachicarpicola* by morphological identification and molecular biological identification. *Morchella* diseases caused by this pathogen often occur in the harvest period of *Morchella*, mainly in February-April, when the temperature is higher than 20°C, and high temperature and high humidity are conducive to the outbreak of the disease. The pathogenicity of the pathogen to *Morchella* is weak. Only when its conidia concentration reaches 1×10^4 CFU can it affect the growth of *Morchella*, and when its conidia concentration reaches 1×10^3 CFU, it can cause the disease of *Morchella*.

(2) The pathogenetic process of *Morchella* wilt was observed for the first time. Morphological changes of *Morchella* wilt were observed by morphological observation, paraffin section technique and microscopic technique. It was found that the pathogen mainly colonized on the lid of *Morchella*, and the hyphae spread along the longitudinal ridge and transverse ridge of *Morchella* in the early stage, forming feathery lesions. After that, it gradually goes deep outward and inward, forming dense white villous lesions, which can lead to perforation of *Morchella* in severe cases. The observation of paraffin tissue morphology showed that the pathogen wrapped the meat of *Morchella* from the outside, secreted cell wall degrading enzymes to decompose the host cell wall, which led to the fragmentation of the host tissue cells, the outflow of nutrients, the expansion of tissues and the emergence of cavities between tissues. Pathogen use

nutrients leaked from host tissues to grow and expand, and hyphae continue to spread into and around the host tissues, eventually causing the tissues of *Morchella* to shrink.

(3) The damage of the pathogen to *Morchella* mycelium was studied. In the co-culture experiment of pathogen and *Morchella*, the hyphae of pathogen can form a "finger" structure, adhere to the hyphae of *Morchella*, and also cling to the hyphae of *Morchella*, causing it to shrink and wither. In addition, the inoculation of the pathogen during the cultivation of *Morchella* can lead to a significant decline in the yield of *Morchella*.

(4) The inhibitory effect of the secondary metabolites of the pathogen on the mycelium growth of *Morchella* was explored. In the confrontation culture of pathogen and *Morchella*, there was no bacteriostatic zone between the two fungi, but obvious antagonistic lines and brown pigment deposition could be observed, and it was found that the aerial hyphae of *Morchella* were affected in the later stage of culture. The fermentation filtrate of the pathogen PD medium hardly affected the growth of *Morchella* mycelium, but volatile substances could inhibit the growth of *Morchella* mycelium, resulting in sparse mycelium and weak aerial mycelium. In PD medium, the pathogen did not produce chitinase and β -1,3 glucanase, but produced neutral protease with low enzyme activity. β -1,3-glucanase, neutral protease and chitinase with high enzyme activity can be produced in diseased tissues of *Morchella*.

(5) The utilization of nutrients in *Morchella* by this pathogen was explored. It was found that the conidia of this pathogen could make full use of nutrients in *Morchella* extract to germinate and grow, and the demand for protein was less in the first 36 hours, but the utilization of soluble sugar was more. A variety of amino acids in the extract of *Morchella* can be used, and cysteine and tyrosine can be produced.

Keywords: *Morchella*; *Pestalotiopsis trachicarpicola*; Etiology; Pathogenic mechanism

第 1 章 前言

1.1 羊肚菌简介

羊肚菌是子囊菌亚门(Ascomycota)盘菌纲(Discomycetes)盘菌目(Pezizales)羊肚菌科(Morchellaceae)羊肚菌属(*Morchella sp.*)真菌^[1]。其以独特的口感风味和超高的营养价值,一直以来广受人们的青睐。

1.1.1 羊肚菌科研价值及经济价值

羊肚菌是一类珍贵的食药两用真菌,其营养价值和药用价值均较高^[2]。据报道,羊肚菌中包含 7 种人体必需氨基酸、多种呈味氨基酸以及多种药用氨基酸,总数可达 17 种,这也就使得羊肚菌具有特别的鲜味和丰富的营养价值^[3]。除此之外,羊肚菌还含有多种生物活性成份如:蛋白质、蛋白质水解物、多糖、多酚化合物、亚油酸、维生素、微量元素和萜类物质等^[4]。拥有如此丰富活性成分的羊肚菌,注定会具有很高的药用价值。早在 400 多年前的《本草纲目》中就记载羊肚菌有“干寒无毒,益肠胃,化痰利气,补脑提神”等功效^[5],而随着科学技术的高速发展,羊肚菌更多的药用价值也逐渐被发现。Hu 等人^[6]研究发现羊肚菌发酵液中含有的新型多糖 MEP-II,可以影响人肝癌 HepG2 细胞的凋亡途径从而抑制肝癌细胞的增殖。Nitha 等人^[7,8]通过对羊肚菌酒精提取物进行研究,其对肝脏具有很好的保护作用。而 Li 等人^[9]则发现在黑脉羊肚菌中蕴含 CPMEP,它是一种化学羧甲基化多糖,具有很明显的降胆固醇作用。总而言之,羊肚菌蕴含多种药用价值,可抗肿瘤、抗疲劳、抗氧化、抗菌、保肾、保肝、调节免疫、调节胃肠蠕动、调控血脂等功效^[10]。

在我国,羊肚菌被誉为“四大名菌”之首,其因鲜、美、脆而得名,颇受人民群众的喜爱,再加上其野生资源匮乏,其珍稀程度可见一般,因此种植羊肚菌具有广阔的前景。丁建等人的研究分析表明:在当前的羊肚菌室外栽培模式下,每亩收益可高达 3 万元^[11],这对于羊肚菌种植者来说是一份非常可观的收入。羊肚菌除了以鲜品、干品和冻品等初加工产品进行售卖以外,还可以对其进行二次加工,增加其附加经济价值。目前,江洁等人就曾通过将豆渣作为液态培养基来培养羊肚菌菌丝体,再联合酒精发酵以及醋酸发酵从而得到了羊肚菌食用菌醋,该醋具有保健美容的功效^[12],非常具有商业前景,这无疑为羊肚菌产业发展增添了一种可能性。其他羊肚菌产品也层出不穷,例如羊肚菌保健品,通过将羊肚菌加工成含片^[13]、口服液^[14]、胶囊^[15]等,还可将羊肚菌制成牛肉酱^[16]、饼干^[17]、复合肉丸^[18]、羊肚菌猪肉灌肠^[19]等食品,各式各样的饮品也种类丰富如:羊肚菌酸奶^[20]、羊肚菌红枣复合营养粉^[21]、羊肚菌粉、玉米粉、魔芋精粉混合固体饮料^[22],

羊肚菌调味酱^[23]也不在少数。这类复合产品具有独特的羊肚菌口感、超高的营养价值高以及特定的药用价值等特点也广受大众的喜爱。

1.1.2 羊肚菌栽培

羊肚菌栽培史经历了三个阶段，第一个阶段最早由 Ower Ronald 先生^[24]提出，通过“层级菌种”生产方法培育菌核，将成熟的羊肚菌菌核作为栽培“种子”，再经过播种、浸水等步骤从而诱导出菇^[25-27]。第二个阶段为仿生栽培，通过模拟羊肚菌的自然生存环境而研发的一种栽培模式，最为经典的是以云南西北的段木树皮作为羊肚菌的营养源，将其营养转化后出菇^[28]。第三个阶段则是利用外源营养袋提供营养促使羊肚菌出菇，此种栽培模式下的羊肚菌产量较前两个阶段的更加稳产高产。因此，目前绝大多数的羊肚菌种植者都采用此种模式^[29]。主要栽培流程为菌种制备→选地→整地→撒生石灰→播种→搭建遮阳棚→施加外源营养袋→养护及出菇管理→防治病虫害→采收→加工→售卖^[30]。

羊肚菌的栽培模式可以影响羊肚菌产量，而菌种的选育则可以直接决定羊肚菌的出菇量^[31]。目前，大面积羊肚菌的人工种植栽培菌种主要选用七妹羊肚菌（*Morchella septimelata*）、梯棱羊肚菌（*Morchella importuna*）以及六妹羊肚菌（*Morchella sextelata*）^[32]。而更加准确优良的羊肚菌菌种选育则较为繁琐，在菌种选育时，常以菌丝生长速度快、菌核数量多、对病害抵抗能力强、菌株遗传性能稳定来作为选育指标^[33]。但是对于羊肚菌准确而完善的选育标准还未确定，羊肚菌优良菌种的选育还将继续努力。

羊肚菌的栽培与当地的气候条件密不可分，早期的羊肚菌栽培集中于川、滇地区，近年来逐渐向北部迁移，目前羊肚菌栽培地遍布贵州、云南、湖北、河南、河北、新疆、东三省、甘肃、陕西、山西、江苏、山东等地^[34]。羊肚菌种植面积也从二零一二年的 3 000 亩增长到了二零二一年的 24.7 万亩^[35]。羊肚菌产业在 10 年间的蓬勃发展离不开羊肚菌栽培技术的逐步完善，当然也离不开各地的乡村振兴政策的扶持^[36]。

1.1.3 羊肚菌生活史

食用菌典型的生活史是指从孢子阶段到孢子阶段的整个生长发育过程。即在适当的条件下，食用菌孢子开始萌发，先形成单核菌丝，再由单核菌丝融合形成双核菌丝，不断发育。到了成熟期，双核菌丝通过纽结长成子实体，子实体继续发育，最后产生新一代孢子。至此，食用菌的生活史画上了句号。对于食用菌来说，其生活史的每一个阶段对食用菌子实体的形成都有非常重要的影响。一旦任何一个环节出现问题，食用菌的产量都会受到影响。

羊肚菌生活史最早由 Volk 先生^[37]在 1990 年详尽阐述，后又经 Pilz^[38]和 Alvarado-Gastillo 先生^[39]补充和总结。简单的来说羊肚菌生活史包含两个途径：一

是随着子囊孢子的成熟，成熟的子囊孢子自然弹射，在适宜的条件下萌发，单一的初生菌丝可通过纽结缠绕形成菌核，菌核在一定条件下出菇。二是羊肚菌初生菌丝可以和其他单孢萌发的初生菌丝融合，形成异核体次生菌丝，进而形成菌核，从而完成生活史。从羊肚菌生活史来看，菌丝对子实体的形成有重大影响，菌丝之间的纽结是羊肚菌子实体形成的关键^[40]，若此步骤受到影响羊肚菌将无法出菇。

1.2 羊肚菌病虫害

羊肚菌病虫害主要包括两类，一是非侵染性病害，二是侵染性病害。真菌性病害、细菌性病害和虫害属于侵染性病害^[41, 42]，而生理性病害则属于非侵染性病害^[43]。羊肚菌侵染性病害具有传染性强、不断漫延等特点。

1.2.1 羊肚菌虫害

羊肚菌虫害包括白蚁、马陆、鼠妇、跳虫、蚊蝇类害虫、蛴螬、螨虫等^[41, 44, 45]。其中，白蚁主要侵袭羊肚菌菌种、菌丝体及外源营养袋，破坏菌丝形态影响羊肚菌出菇，与羊肚菌竞争外源营养袋营养^[44]；马陆又称千足虫，主要存在于子囊果根部，以其菌肉为食，严重时也可影响羊肚菌菌丝网形成，致使子实体停止生长发育^[41]；鼠妇对羊肚菌土壤内菌丝会有较大危害；跳虫则危害羊肚菌整个生长周期，播种后咬食羊肚菌的菌丝，还可钻进外源营养袋中利用袋中营养，出菇后可钻入子实体内，啃食菌肉，导致子实体畸形商品性降低；蚊蝇类幼虫可生活在外源营养袋及子实体菌柄部，影响菌丝的生长及子实体的营养吸收，导致幼菇死亡或子实体畸形；蛴螬一般啃食羊肚菌原基及幼嫩的羊肚菌子实体，被啃食的子实体部位停止发育，最终导致畸形；螨虫一般寄生在羊肚菌菌柄内侧，导致组织变红^[41]。总而言之，羊肚菌虫害一般危及羊肚菌菌丝及子囊果，抑制菌丝的生长、营养物质的传递及存储，并影响子囊果的生长及形态，降低其产量和商品性^[42]。值得注意的是，害虫身上往往带着多种病原菌，羊肚菌子实体一旦遭到害虫啃食损坏，便容易引起子实体间的交叉感染，从而导致真菌性、细菌性病害的不断传播^[42]。

1.2.2 羊肚菌病害

1.2.2.1 细菌性病害

目前关于羊肚菌细菌性病害的研究报道较少，主要包括两种，即软腐病和红体病^[41]。羊肚菌在感染软腐病病原菌后，其子实体断折，菌柄枯烂，病症可蔓延至全株，严重时还可致使羊肚菌组织腐烂，腐烂组织呈脓状或水浸状，并伴随恶臭味。羊肚菌红体病主要症状为，子实体感染病菌后，停止生长，整菇变红且散发臭味，此病菌可随雨水、风和空气流动而散播，因此一旦感染就会导致大面积羊肚菌死亡，并且发病区域不会再长出新的子实体^[42]。

1.2.2.2 真菌性病害

羊肚菌真菌性病害具有隐匿性强、暴发速度快、感染范围广等特点，目前缺少有针对性的生化防治方法，因此真菌性病害是羊肚菌产业现阶段最重要的病害。真菌性病害不仅危害羊肚菌出菇，在羊肚菌菌种制备阶段也时常发生^[46]。在羊肚菌种植和制种时常会遭到木霉、毛霉、曲霉、根霉^[47]等杂菌的影响^[48-50]。而对羊肚菌子囊果造成危害的病原真菌主要有以下几种。菌柄腐烂病主要分为两种，一是由 *Fusarium incarnatum-F. equiseti* 复合群^[51]引起的，主要定植于菌柄，也能侵袭菌盖，病变部位附着白色菌丝，在 25℃ 的高温高湿环境下，白色菌丝可在 3-5 天覆盖整片子囊果，最终致使发病部位枯萎、子实体畸形^[51]。另外一种由 *Fuvarium nematophilum*^[52]所引起，可导致子实体菌柄乌黑病变，甚至萎缩干枯。镰刀菌可分泌镰刀菌素，该分泌物有毒，食用患病羊肚菌可导致身体不适，因此感染镰刀菌的羊肚菌子实体不能再食用^[49]。羊肚菌枯萎病又称白霉病、干腐病、菌盖枯萎病，主要症状为菌盖表面出现轻微白色病变，菌丝体逐渐侵入组织内部，吞噬羊肚菌的菌肉，随后子囊果塌陷开裂，形成穿孔，导致子囊果畸形。不同病原菌引起的症状略有差别。*Diploöspora longispora*^[53, 54]引起的病害导致羊肚菌菌盖腐烂枯萎，子实体畸形，*Paecilomyces penicillatus*^[55]导致的羊肚菌病害不仅发生在菌盖上，还发生在菌柄中，致使羊肚菌穿孔。潘启强等认为长毛拟青霉和镰刀菌均能导致羊肚菌的枯萎病^[56]。余苗等人还发现曲霉菌属真菌也可导致羊肚菌白腐病^[57]。本实验室也发现了一种拟盘多毛孢属的羊肚菌枯萎病病原真菌^[58]。除此之外，羊肚菌蛛网病也常常发生，该病一般由外源营养袋中萌发出菌丝，菌丝粗壮如蛛网，蔓延速度较快，遍布范围较广，菌丝自羊肚菌子囊果根部向上侵袭整株，经 Lan 等人分离鉴定，该病由 *Cladobotryum protrusum*^[59]所引起。

1.2.3 羊肚菌生理性病害

羊肚菌生理性病害主要包括水害（土壤长时间积水）、热害（温度过高）、冻害（温度过低）、风害（风量过强）^[44, 60]。水害主要是由于长时间积水，从而导致土壤粘结、缺氧，进而致使羊肚菌子囊果瘦弱，或提早成熟并且容易腐烂。冻害发生在原基形成后，若温度过低则容易致使羊肚菌菌柄变灰，菌帽分化不完整。热害，若温度过高，在适宜的水分下，羊肚菌容易疯长，长出菌柄粗壮，但肉薄菌盖短小的畸形菇，还会有菌盖顶部凹陷子囊果呈圆形的子实体出现，严重降低羊肚菌商品性^[49]，除此之外高温还会增加羊肚菌染病的可能性。风害则可导致原基和幼菇死亡。

1.2.4 羊肚菌病害的防治

食用菌病害防治一般遵守“预防为主，综合防治”的方针^[61]，羊肚菌作为商品性食用菌，一旦遭到病虫害的侵染，将对其品质和商业价值产生重大影响，因此预防病虫害是保证羊肚菌商业价值的关键。综合防治是将农业防治、物理防治、

化学防治、生物防治等切实有用的手段结合起来，合作应用，形成有规划的、周全的、高效的防治体系，以达到将疾病控制在最小范围和最低水平的要求^[61]。保证菌种质量，选择抗病性强、抗逆性强的优良菌种是预防羊肚菌患病的前提^[41, 62]；通过喷施生石灰、农药、生防剂、火烧的方式减少病虫害的基数控制病虫害的传播源头^[63, 64]，是预防羊肚菌患病的有效途径，见白就摘、见病就采、保持合适的温度和湿度^[64]，切断病原菌的传播途径则是防治羊肚菌患病的必要措施。

1.3 拟盘多毛孢研究现状

1.3.1 拟盘多毛孢分类

对于拟盘多毛孢属的分类存在较大争议，不同学者对其分类的依据不同，从而导致该属真菌种属鉴定非常困难^[65, 66]。拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis* sp.)最早是由 Steyaert^[67]于 1949 年根据分生孢子中间为有色细胞及顶端具附属丝的形态而分类，将分生孢子具有 5 个细胞，中间三个细胞深色的种从盘多毛孢属(*Pestalotia* sp.)中分离出来，归入拟盘多毛孢属中，该分类并未将顶端附属丝作为分类依据。但 Sutton^[68]学者认为拟盘多毛孢分生孢子的细胞数以及尖端附着丝均是分类种属的重要特征，所以他认为该属的分类特征为分生孢子具 4 个真隔膜，顶端附属丝 2 根至多根。而 Nag Raj^[69]则将分生孢子细胞含有 3 或 4 个分隔，顶端附着丝为单根后分枝或 2 至多根，尾部附属丝一根作为该属分类特征。总之对于该属的分类特征各位学者的意见并不一致，但是都大同小异，目前对于拟盘多毛孢属的分类特征定义为分生孢子纺锤形，具 5 细胞，两端细胞无色或近无色，中间三细胞深色，顶胞着生一根至多根分枝或不分枝的附属丝，基部柄有或无^[70]。

对于拟盘多毛孢属内种的分类，主要采用 Guba^[71]关于 *Pestalotia* 的分种方法，根据分生孢子细胞的有色孢类型、末端膨大与否、顶端附属丝数目、基部附属丝有无等进行种属鉴定。但是由于拟盘多毛孢属内种与种之间的分生孢子形态特征过分重叠，许多种的种间界定非常不明确，并且不同的人对其形态特征的描述都大不相同，因此仅用形态特征对拟盘多毛孢属进行分类鉴别有很大困难^[72]。若要准确鉴定还需与分子系统学相结合。真菌核糖体基因转录间隔区 (ITS) 中包含大量高度可变的无义序列，对真菌种属鉴定有很大意义^[73]，因此对拟盘多毛孢属进行种属分类鉴别时常用 ITS 序列作系统发育树分析，然而仅采用单基因系统发育分析难以准确揭示其分类学地位^[74]。Maharachchikumbura 等人对 10 个基因区进行系统发育的分析，发现联合 ITS 序列、 β -*tubulin* 及 *tefl* 基因进行多基因联合系统发育树的分析对拟盘多毛孢属的种内鉴别有很好的分辨率^[75, 76]。因此在此后的拟盘多毛孢属分类鉴别研究中大多采用这种方法^[77-79]。

1.3.2 拟盘多毛孢引起的病害

拟盘多毛孢属真菌是多种植物的病原菌，可感染宿主多种部位。除了可导致种子、苗木的病害之外，还可引起叶斑病、枯枝病、和果腐病。其中叶斑病最为常见，主要宿主包括茶叶^[80]、红叶石楠^[81]、滇重楼^[82]、刺葡萄^[83]、牡丹^[84]、香蕉^[84]、草莓^[85]等。典型症状为：感染初期，宿主叶片上出现褐色圆形、半圆形或不规则形病斑，后期颜色逐渐变为灰褐色至灰白色，最终导致病叶脱落，严重时还可影响整株植物生长。枯枝病多发生在蓝莓^[86]、山核桃^[87]和枇杷^[88]上，植株树枝先是出现病斑，随着病程发展逐渐导致树枝枯萎，或是导致树皮变色开裂。果腐病主要发生在葡萄^[89]、猕猴桃^[90]、红毛丹^[91]、番石榴^[92]、柿子^[93]等的采收期和储藏期，主要是在果实受损后，易感染病菌，病斑处出现深棕色至黑色斑点，溃烂，后期长出白色菌丝，每个物种的感染现象会有所差异。除此之外，还引起杉木、草莓烂种、腐根和幼苗生长衰弱等问题^[94-97]。但目前为止，还未发现该属真菌在大型真菌上的致病作用。

棕榈拟盘多毛孢承袭了属的致病特点，它也曾被多次发现对多种植物致病，可造成白皮松^[98]的枯枝病，导致白皮松树枝溃烂，溃烂面积随时间逐渐增大，还可导致葡萄果实腐烂和茎的疾病问题，在这里葡萄果实的发病速度要比茎更迅速^[99]，除此之外在茶叶^[100]、红叶石楠^[101]、杜仲^[102]和芒果^[103]的生长过程中也发现了棕榈拟盘多毛孢引起的叶斑病。

1.4 病原真菌致病机制研究现状

1.4.1 菌丝机械作用

病原真菌感染宿主时，一般会形成菌丝特化结构，这种结构称为“侵染结构”，主要包括附着胞（Appressorium）、侵染垫（infection cushion）、侵染钉（penetration peg）和吸器（Haustorium）^[104]。附着胞能够吸附在植物表面，并分泌细胞壁降解酶，从而促进宿主细胞壁降解，进一步入侵寄主。感染垫功能与附着胞类似，它能够产生黏液，这种粘液可以将自身附着于宿主表面，除此之外，感染垫还能够产生很细的穿透性菌丝，进一步侵入植物细胞壁。吸器的主要功能是吸收营养，许多植物寄生真菌都生长在宿主植物表面，它通过菌丝附着于寄主上，并发出分支侵入宿主细胞吸收宿主营养，以供给自身生长繁殖^[105]。侵染结构受多种基因调控，据报道，*MSB2* 基因可编码跨膜粘蛋白 *Msb2*，该基因突变将会影响病原真菌侵染结构的形成^[106-109]。除此之外，*PMK1* 基因也可调控稻瘟病菌的附着胞形成，该基因的突变，会导致稻瘟病菌附着胞结构消失，而附着胞一旦消失，稻瘟病菌将无法在水稻组织中存活^[110]。

病原真菌除了通过侵染结构入侵宿主外，还可直接通过菌丝的机械损伤作用侵入宿主。在研究双孢蘑菇湿泡病时，张春兰等人^[111]就发现病原菌 *Hypomyces perniciosus* 在不形成侵染结构的情况下，同样能侵入双孢蘑菇。其孢子首先附着在

双孢蘑菇担子体表面，然后萌发菌丝并穿透双孢蘑菇担子体。此外，病原真菌还可通过菌丝缠绕作用影响食用菌菌丝生长，以及后期出菇^[112]。在病原菌与双孢蘑菇菌丝的对峙试验中，病原菌菌丝与双孢蘑菇菌丝互相缠绕，并可形成回形针样结构，最终可导致双孢蘑菇菌丝枯萎、溶解等^[113]。在探究木霉对食用菌的致病机理时，同样发现木霉可通过菌丝缠绕作用，抑制食用菌菌丝生长^[114, 115]。有趣的是在木霉与病原真菌的对峙试验中，木霉菌丝同样会与植物病原菌菌丝相互缠绕，甚至会产生次生菌丝侵入到病原菌菌丝中^[115]。

1.4.2 毒素作用

病原真菌代谢可产生多种物质，其中毒素是病原真菌在进行物质和能量交换的过程中产生的对宿主有危害的非酶类化合物，即使在低浓度下也能影响宿主正常的生理功能^[116]。目前，植物病原真菌毒素可分为两类，一是寄主专化性毒素，二是非寄主专化性毒素。这种分类方法主要是根据毒素对宿主的特异性^[117]。即寄主专化性毒素对寄主的选择性强、专一性强。例如链格孢属、长蠕孢属和刺盘孢属均可产生寄主专化性毒素^[118]。而非寄主专化性毒素对寄主的选择性弱，即使是非寄主也能对其生理活性造成影响。目前报道的疫霉属、尾孢菌属、轮枝孢属、梨孢霉属产生的毒素则为非寄主专化性毒素^[116]。

研究发现毒素的作用位点包括质膜、线粒体、叶绿体等。毒素可通过影响形成质膜的蛋白质和膜脂来改变质膜的通透性，导致细胞内外电解质异常，进而引起一系列问题。对线粒体的损伤主要是通过影响宿主细胞呼吸过程中的还原型辅酶 I、琥珀酸、苹果酸的氧化，进而导致呼吸链中的氧化磷酸化解偶联，最终阻碍细胞呼吸。对叶绿体的损伤主要有两个方面，一是促使叶绿体解体，二是通过抑制电子从叶绿体光系统 II 向光系统 I 的传递，从而导致 ATP 合成下降^[119]。

目前，病原真菌毒素对食用菌的影响研究还较少，据报道镰刀菌可感染羊肚菌，并分泌镰刀菌素，进而影响羊肚菌生理功能^[45]。*Paecilomyces penicilatus* 可引起羊肚菌白霉病，在对峙培养中发现青霉菌可分泌某些对羊肚菌菌丝生长有抑制作用的可溶性化合物^[120]。金黄菌寄生菌发酵液可抑制真姬菇菌丝生长导致菌丝稀疏^[121]。木霉发酵液对多种食用菌菌丝均有抑制作用，并且经食用菌菌丝诱导后，其抑制作用可增强^[114]。有害疣孢霉粗毒素提取液对双孢蘑菇具有致病性^[122]。除此之外，其挥发物质亦可抑制双孢蘑菇菌丝生长^[123]。总状炭角菌可分泌活性物质破坏鸡腿菇细胞，导致其菌丝细胞膜透性增加、电导率升高^[124]。以上均表明病原真菌可通过毒素进一步感染食用菌宿主，但其研究还较为浅显，还将继续深入探索。

1.4.3 细胞壁降解酶的作用

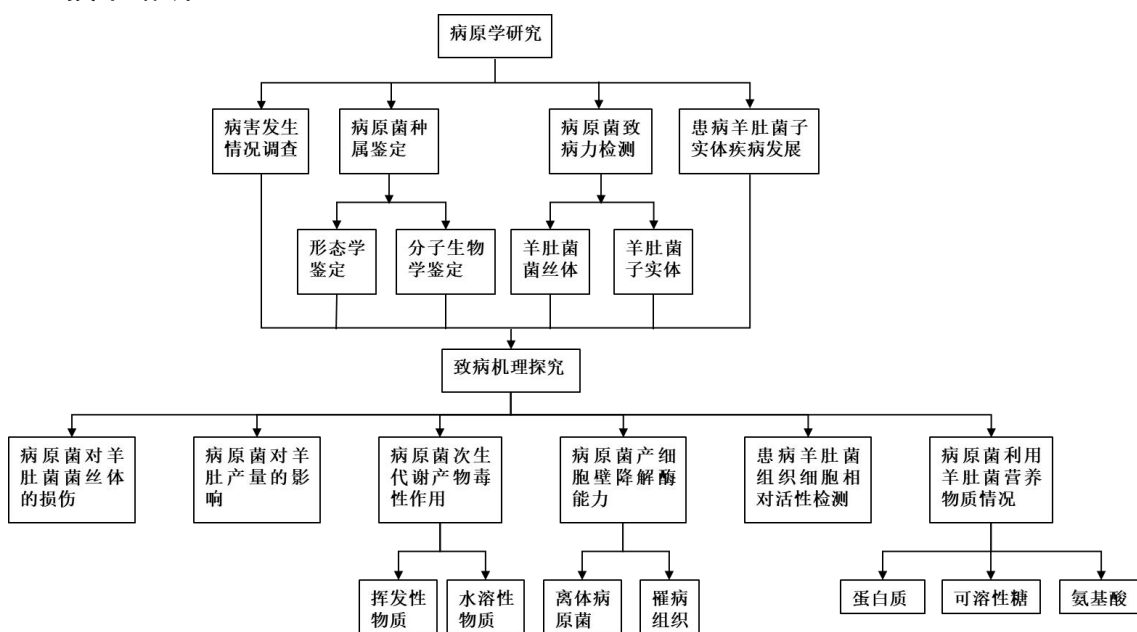
细胞壁是植物和真菌的重要物理防御屏障，在抵抗病原真菌的侵染中起着重要作用^[125]。病原真菌可分泌细胞壁降解酶以破坏这层屏障。主要的细胞壁降解酶

包括葡聚糖酶、几丁质酶、蛋白酶、果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶等。这些降解酶不仅可分解宿主细胞壁,促进病原菌入侵,还能够充当宿主抗病的诱导因子^[126]。有研究指出,病原真菌的致病性与其自身产细胞壁降解酶的活性呈正相关,例如,在研究人员探索苹果树腐烂病原菌的致病关键因子与病原菌株致病性关系时,就发现细胞壁降解酶活性高且持续时间长的菌株具有更高的致病性^[127]。在柑橘和马铃薯病菌中,如果将病原真菌 *Alternaria citri* 内聚半乳糖醛酸酶基因突变,其对柑橘和马铃薯的浸渍能力也会显著下降,甚至不能在柑橘皮上定殖^[128]。此外,测定接种病原菌后第3天和6天的长毛拟青霉和六妹羊肚菌的表达谱时,也发现长毛拟青霉中 β -葡聚糖酶和甘露聚糖酶的 CAZymes, 以及枯草酶家族基因表达上调。以上均表明细胞壁降解酶是病原真菌侵染宿主(植物或食用菌)的重要手段。

1.5 论文研究的目的及意义

羊肚菌作为有名的食用菌,它不仅具有很高的食药价值,还具有非常高的经济价值,目前,在我国多地均有栽培,栽培面积已达24.7万亩。然而在栽培过程中,羊肚菌枯萎病却时常发生,这给羊肚菌种植者带来了巨大的经济损失。因此探究羊肚菌枯萎病的病原学及其致病机制十分有必要,这将有利于羊肚菌枯萎病的病害防治。

1.6 技术路线



第2章 拟盘多毛孢引起的羊肚菌病害病原学研究

羊肚菌在四川地区广泛栽培，是四川重要的经济栽培菌。前期，本课题组在南充世顺农业有限公司的羊肚菌栽培基地发现了一种羊肚菌枯萎病，经分离纯化鉴定及科赫氏法则验证，该病害是由拟盘多毛孢属真菌所引起。该属真菌在羊肚菌中引起的病害是首次被发现，并且该病害的影响范围广危害大，因此本论文就病原菌引起的羊肚菌病害病原学进行了研究。调查了该病害的发生情况，明确了引起该病害病原菌的种属和其致病力，了解了该病害的发病进程，这可以为病害的预测预警和防控提供理论依据。

2.1 试验材料

2.1.1 供试菌株

拟盘多毛孢菌株(*Pestalotiopsis* sp.): 由“西南野生动植物资源保护”教育部重点实验室真菌资源研究室分离并保存;

六妹羊肚菌 (*Morchella sextelata*): 由“西南野生动植物资源保护”教育部重点实验室真菌资源研究室分离并保存。

2.1.2 试验试剂

PDA 培养基: 200g 土豆、20g 无水葡萄糖、20g 琼脂、1000mL 蒸馏水;

真菌基因组提取试剂盒: 购自生工生物工程有限公司;

石蜡组织切片相关试剂: 不同浓度乙醇、二甲苯、切片石蜡(熔点 58°C-60°C)、亚甲基氧、冰乙酸、丙三醇、FAA 固定液(5mL 丙三醇、5mL 38%亚甲基氧、5mL 冰乙酸、90mL 50%酒精)。

2.1.3 试验仪器

表 2-1 试验仪器

Table 2-1 Experimental apparatus

仪器名称 Instrument name	型号 Type
干湿球温度计	TAL-2
手动计数器	JXJSQ
血球计数室	XB-K-25
石蜡包埋机	ES-300
石蜡切片机	RM2235
生物显微镜	BA310-T
图像采集器	moticam2306
生化培养箱	SPS-151
PCR 仪	T100
琼脂糖水平电泳槽	DYCP-31BN/CN/DN
凝胶成像系统	GelDocXR+/XRS+1708195

2.2 试验方法

2.2.1 病害发生情况调查

调查地点：本课题组自 2020 年开始先后在四川南充、阆中、广安羊肚菌种植区进行病害调查。

调查指标：观察测量患病羊肚菌所处环境温度、湿度、通风状况及整体环境。

2.2.2 病原菌种属鉴定

形态学鉴定：

将羊肚菌病原菌置于 PDA 培养基中活化，然后将活化病原菌接种于 PDA 平板中，25℃、静置、黑暗、自然湿度下培养数天。观察其菌落形态特征。待其长出分生孢子堆后，用枪头挑取分生孢子，将其用无菌蒸馏水在载玻片上散开，盖上盖玻片，制成装片。置于生物显微镜下观察其形态特点，并随机选取显微视野下的 25 个分生孢子，测量其各个细胞长度、宽度，附属丝数量、长度以及尾部疣的长度。

分子生物学鉴定：

将病原菌接种于 PDA 平板中，25℃、静置、黑暗、自然湿度下培养数天，至菌丝布满培养基，刮取表面菌丝体，使用真菌基因组提取试剂盒提取菌株全基因组 DNA，用引物 BT2A、BT2B 扩增 *β-tubulin* 基因，引物 ITS1、ITS4 扩增 ITS 序列，引物 EF1-526F、EF1-1567R 扩增 *tefl* 基因。引物序列如表 2-2 所示，扩增反应体系及程序根据文献^[75]配置及设置。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，合格后，送至生工生物工程（上海）有限公司进行测序。用 DNAMAN 软件将测序结果进行拼接，然后将拼接结果在 NCBI 网站中通过 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 进行序列比对，根据比对结果选取合适序列构建系统发育树。首先按照 *tefl*、ITS、*β-tubulin* 的序列顺序将测序序列和比对序列分别拼接，再用 MEGA7 软件进行建树，多序列比对采用 ClustalW 程序进行，系统发育树的构建采用邻接法 (NJ) 进行，并用 Bootstrap 进行自举检验，重复次数为 1000 次。

表 2-2 分子鉴定使用引物序列

Table 2-2 Primer sequences of molecular identification

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	扩增产物名称 Name of amplification product	扩增产物大小/bp Amplification product size/bp
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	586
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
BT2A	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	<i>β-tubulin</i>	458
BT2B	ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTGGC		
EF1-526F	GTCGTYGTYATYGGHCAYGT	<i>tefl</i>	965
EF1-1567R	ACHGTRCCRATACCACCRATCTT		

2.2.3 病原菌致病力检测

2.2.3.1 病原菌浓度对羊肚菌菌丝生长影响

将病原菌分生孢子分别制成浓度为 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 个/mL 的分生孢子悬液。制作方法如下：用无菌接种环挑取病原菌分生孢子堆置于无菌蒸馏水中，摇匀，使用血细胞计数板计数，使其浓度达到 1×10^6 个/mL，通过浓度梯度稀释的方法获取不同浓度的病原菌分生孢子悬液，下同。分别吸取 200 微升不同浓度的病原菌分生孢子悬液置于 PDA 培养基上，刮铲涂平，每个浓度做 3 次重复。以无菌水作为对照，后接种直径为 5mm 的羊肚菌菌块，置于 22°C 黑暗条件下培养，每 24h 观察一次羊肚菌生长情况及病原菌分生孢子萌发情况。

接种第 6 天后，用十字交叉法量取试验组羊肚菌菌落直径，并计算菌落抑制率。菌落抑制率 = $\frac{(\text{对照组的菌落直径} - 0.5\text{cm}) - (\text{试验组的菌落直径} - 0.5\text{cm})}{(\text{对照组的菌落直径} - 0.5\text{cm})} \times 100\%$ 。每个处理重复 3 次。

2.2.3.2 病原菌浓度对羊肚菌子实体患病影响

按照常规的种植方法种植羊肚菌，待羊肚菌子实体高度长至约为 6cm 时，用无菌小刀在菌盖上切取一个约 5mm 的伤口，在伤口处分别接种 200 μ L 不同浓度 (1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 个/mL) 的病原菌分生孢子悬液，以接种无菌水为对照，每个浓度做 3 次重复，接种完成后在其菌盖上套上空间足够的无菌小袋，以避免外来病原菌的影响，然后使之在自然条件下继续生长，每 3 天观察一次羊肚菌患病情况。

2.2.4 患病羊肚菌子实体疾病发展进程研究

获取患病羊肚菌，将病原菌分生孢子制成浓度为 1×10^5 个/mL 的孢子悬液，选取 15 株大小相近高度约 6cm 的健康羊肚菌子实体，用无菌小刀在羊肚菌菌盖上划出大小约 5mm 的伤口，在伤口处接种 200 μ L 浓度为 1×10^5 个/mL 的病原菌孢子悬液。接种完成后在其菌盖上套上空间足够的无菌小袋，以避免外来病原菌的影响，然后使之在自然条件下继续生长。每隔 3 天观察一次羊肚菌病斑情况并随机选取 3 株患病羊肚菌进行组织包埋，第 12 天截止。以正常羊肚菌组织为对照，将所有包埋组织进行切片，染色并观察。具体的试验步骤如下：

- (1) 固定：将选取的患病羊肚菌组织置于 FAA 固定液中固定 24h。
- (2) 冲洗：将样品放入包埋盒，用 50% 酒精浸泡 1h。
- (3) 脱水：依次用不同浓度酒精 (70% → 80% → 95% → 100% I → 100% II) 浸泡样品 1h。
- (4) 透明：用乙醇:二甲苯=1:1 混合液处理样品 2h，再用纯二甲苯处理 2h。
- (5) 浸蜡：将样品用二甲苯:石蜡=1:1 混合物浸泡 2-20h，为保证混合物始终为液体需将其置于 50°C 烘箱中，再用纯石蜡浸泡 3h。

- (6) 包埋：将试验标本按预定方向摆好，置于石蜡包埋机上包埋。
- (7) 晾干：将包埋好的材料置于阴凉处冷却晾干，然后取下包埋组织，置于 4℃ 冰箱保存。
- (8) 切片：用切片机将包埋石蜡切成厚度为 10 μ m 的薄片，在 37℃ 的蒸馏水中展开，再用粘附载玻片粘片，置于 45℃ 烘箱中烘干。
- (9) 脱蜡：将烘干后的样片用纯二甲苯脱蜡两次，每次 10min。
- (10) 复水：将样片依次置于无水乙醇→无水乙醇→95%乙醇→90%乙醇→70%乙醇→蒸馏水中，每次 5min。
- (11) 染色：用甲苯胺蓝溶液浸泡 5min 再迅速用水冲洗。
- (12) 脱水：依次用 70%乙醇、80%乙醇、95%乙醇、无水乙醇浸泡样片，每次 1 min
- (13) 封片：待乙醇挥发 15min，纯二甲苯处理 15min，用中性树脂封片，待其干透便可置于显微镜下观察。

2.3 统计及数据处理

采用 IBM SPSS Statistics 26 软件、Excel2019 及 MEGA7 软件对所测数据进行显著性差异分析、数据处理及绘图。

2.4 结果与分析

2.4.1 病害发生情况调查

对西华师范大学校内羊肚菌栽培基地、广安市礼安镇羊肚菌栽培基地、南充市东观镇羊肚菌栽培基地及阆中市羊肚菌栽培基地的羊肚菌病害发生情况进行调查，发现各种植区自开始种植羊肚菌以来，均发现有白色霉变的羊肚菌枯萎病（图 2-1）。除阆中羊肚菌栽培基地外，其余栽培基地的患病羊肚菌较多。其发病症状与之前分离病原菌的羊肚菌病株病症一致。对其白色病变处病原菌菌丝进行采集，将其接种于 PDA 平板中，纯化并观察其菌落形态，发现其菌落形态与拟盘多毛孢菌株一致。

观察该病害的发病时间和环境发现，该羊肚菌病害多发生在羊肚菌采收期，主要在 2-4 月，此时温度较高可达到 20℃ 以上。阆中栽培基地患病羊肚菌较少，可能关键在于此处温度较其余地区温度更低。除此之外，该病害还常发生在羊肚菌与油菜间种的地方以及在温度高时未撤薄膜的地方，推测可能是由于间种油菜，提高了栽培地的湿度并增加了病原菌附着位点从而增大了羊肚菌感染该病原菌的可能性。而在高温时没有撤掉薄膜，一方面增加了温度和湿度，另一方面减少了通风导致病原菌更容易感染和附着在羊肚菌上。此外，若羊肚菌栽培土壤中残留有其他农作物的残渣，也容易增大患病的可能性。



图 2-1 羊肚菌病害发生情况

Fig.2-1 Situation of Morchella disease

2.4.2 病原菌种属鉴定

形态鉴定：病原菌在 PDA 上培养 7 天，菌落直径达 9cm，边缘呈流苏状，整体白色致密（图 2-2A），背面呈黄白色（图 2-2B），分生孢子堆黑色、球形、黏液状（图 2-2C）。产分生孢子细胞呈花状，透明似玻璃（图 2-2D）。分生孢子呈梭形，直立或弯曲，由 5 个细胞组成，四分隔，长 $21.0\text{-}28.6\mu\text{m}\times 6.0\text{-}7.6\mu\text{m}$ ($\bar{x}=24.8\mu\text{m}\times 7.0\mu\text{m}$) 顶端细胞透明圆锥状， $2.7\text{-}4.5\mu\text{m}$ 长 ($\bar{x}=3.7\mu\text{m}$)，其顶端有 2-4 根管状顶端附件， $6.0\text{-}19.3\mu\text{m}$ 长 ($\bar{x}=10.2\mu\text{m}$)；中间三个细胞同色或异色呈棕色至橄榄色有黑色素沉积，形状呈瓮形至圆柱状，分隔处缢缩，其外周壁及隔膜较两端细胞壁颜色深，第二细胞长 $4.6\text{-}5.9\mu\text{m}$ ($\bar{x}=5.4\mu\text{m}$)，第三细胞长 $4.4\text{-}6.0\mu\text{m}$ ($\bar{x}=5.1\mu\text{m}$)，第四细胞长 $4.1\text{-}6.5\mu\text{m}$ ($\bar{x}=5.3\mu\text{m}$)，基底细胞透明圆锥状、急尖形，长 $3.3\text{-}7.2\mu\text{m}$ ($\bar{x}=5.2\mu\text{m}$)，尾部长有小疣，长 $2.4\text{-}6.9\mu\text{m}$ ($\bar{x}=4.5\mu\text{m}$)（图 2-2E-H）。通过阅读文献^[75]发现该病原菌形态与棕榈拟盘多毛孢形态一致。

分子生物学鉴定：将 PCR 扩增片段送至生工生物工程有限公司测序，得到 586bp 的 ITS 部分序列、458bp 的 $\beta\text{-tubulin}$ 基因部分序列以及 965bp 的 *tef1* 基因的部分序列，将三条序列上传至 genbank 获得登录号分别为 OL362082、OL828342、OL905009。将测序结果在 NCBI 网站上比对，结果显示，菌株三条序列均与棕榈拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis trachicarpicola*) 同源性高达 98%-100%。将其三条序列连接后，选取相似菌株进行多序列联合建树，利用 MEGA7 软件，构建系统发育树（图 2-3），病原菌与 *Pestalotiopsis trachicarpicola* 菌株 YB1 聚在同一分支，且检验值高达 100%。

综合形态学鉴定和多基因联合分析将病原菌鉴定为棕榈拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis trachicarpicola*)。

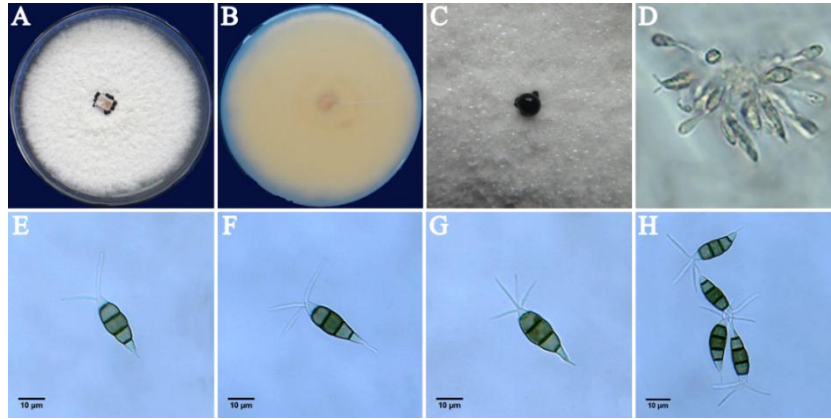


图 2-2 病原菌形态特征

Fig.2-2 Morphological characteristics of pathogen

A: PDA 培养基中病原菌正面菌落形态; B: PDA 培养基中病原菌背面菌落形态; C: 病原菌分生孢子堆; D: 产分生孢子细胞; E-H: 病原菌分生孢子形态

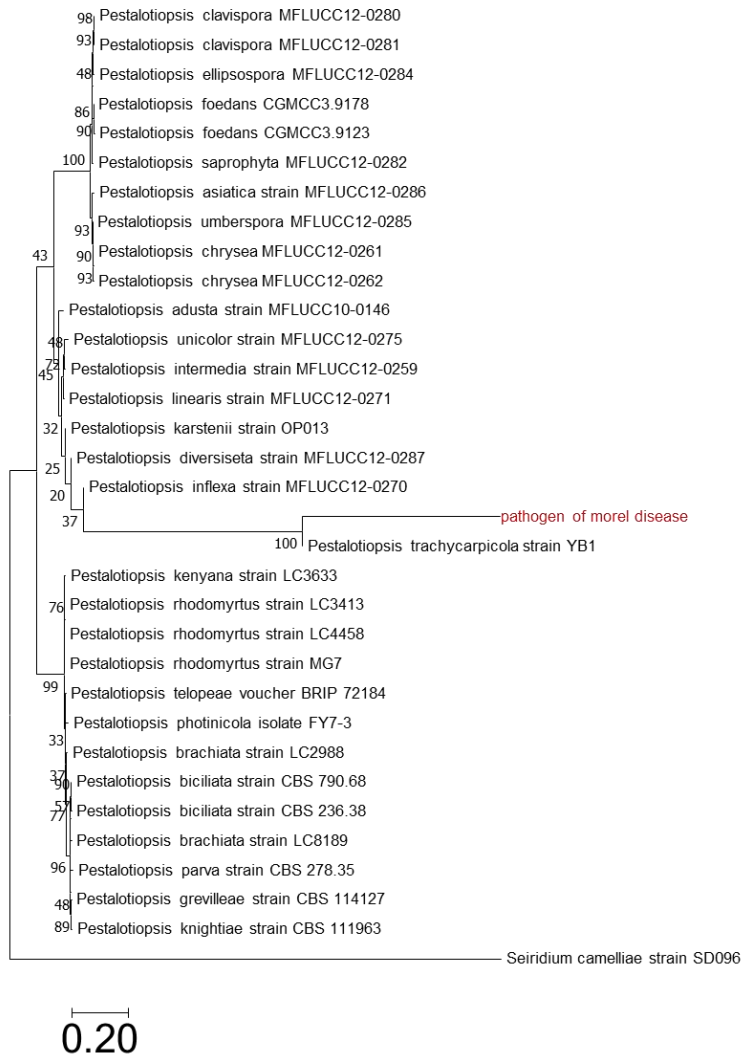


图 2-3 *tef1*、ITS、 β -*tubulin* 多基因联合系统发育树

Fig2-3 Phylogenetic tree combine *tef1*, ITS and β -*tubulin*

2.4.3 病原菌致病力检测

2.4.3.1 病原菌浓度对羊肚菌菌丝体影响

通过对不同浓度的病原菌分生孢子与羊肚菌菌丝体的共培养观察发现，病原菌分生孢子浓度为 1×10^6 、 1×10^5 及 1×10^4 个/mL 的试验组病原菌分生孢子在第 2 天时开始萌发，萌发程度具有差异性，且浓度越高萌发现象越明显，对羊肚菌生长的抑制效果也越明显。浓度为 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 个/mL 的试验组未有分生孢子萌发，羊肚菌菌丝生长情况与对照组一致。培养第 4 天，浓度为 1×10^6 、 1×10^5 个/mL 的试验组病原菌生长旺盛，较羊肚菌生长更具优势，并开始长出分生孢子堆，但不明显。浓度为 1×10^4 个/mL 的试验组病原菌在边缘生长，但羊肚菌生长更具优势，并且还未长出分生孢子堆。浓度为 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 个/mL 的试验组病原菌仍未萌发。培养第 6 天，浓度为 1×10^6 、 1×10^5 个/mL 的试验组病原菌产生了更为浓密的分生孢子堆，除此之外，浓度为 1×10^4 个/mL 的试验组也产生了分生孢子堆，但较少。然而浓度为 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 个/mL 的试验组病原菌分生孢子仍未萌发。在后续观察中，浓度为 1×10^6 、 1×10^5 个/mL 的试验组病原菌菌丝生长情况与前期一致，但随着时间的推移产生了更多的分生孢子堆，浓度为 1×10^4 个/mL 的试验组羊肚菌长出了更多的气生菌丝覆盖在了病原菌之上。浓度为 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 个/mL 的试验组病原菌分生孢子也依然未能萌发，羊肚菌生长情况与对照组一致（图 2-4）。测量培养第 6 天的羊肚菌菌落直径，发现羊肚菌菌落直径在病原菌浓度为 1×10^4 个/mL 时显著降低，不同病原菌分生孢子浓度对羊肚菌菌落抑菌率依次为：0、0、0、20.89%、57.89%、91.44%（表 2-3）。

综上所述，病原菌分生孢子浓度达到 1×10^4 个/mL 时，可以抑制羊肚菌菌丝生长，但抑制效果并不明显，揭示病原菌对羊肚菌来说为弱致病菌，仅有达到一定浓度时才会对羊肚菌菌丝生长造成影响。

表 2-3 不同病原菌分生孢子浓度对羊肚菌菌丝的影响

Table 2-3 Effect of different conidial concentrations on mycelia of Morchella

分生孢子浓度 (个/mL)	对照	1×10^1	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6
羊肚菌菌落直径 (cm)	9.00a	9.00a	9.00a	9.00a	7.12±0.08b	3.79±0.11c	0.77±0.02c
菌落抑菌率 (%)		0	0	0	20.89	57.89	91.44

注：不同英文小写字母表示差异显著性($P < 0.05$)

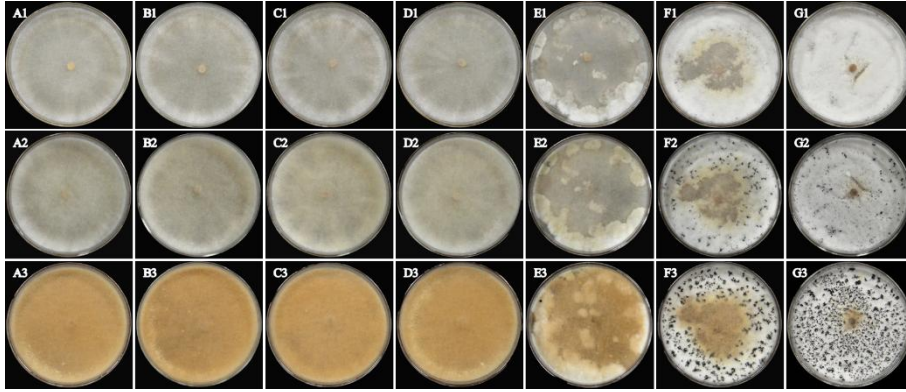


图 2-4 病原菌分生孢子浓度对羊肚菌菌丝生长的影响

Fig.2-4 Effect of sporogenous concentration on mycelium growth of Morchella

A1-G1: 培养第 4 天, 病原菌分生孢子浓度依次为 0、 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 个/mL; A2-G2: 培养第 6 天, 病原菌分生孢子浓度依次为 0、 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 个/mL; A3-G3: 培养第 15 天, 病原菌分生孢子浓度依次为 0、 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 个/mL

2.4.3.2 病原菌浓度对羊肚菌子实体患病的影响

通过将不同浓度的病原菌分生孢子悬液接入受伤的羊肚菌菌盖, 观察羊肚菌患病情况, 发现当接种病原菌分生孢子浓度达到 1×10^3 个/mL 便可导致羊肚菌患病, 并且随着病原菌接种浓度越高, 羊肚菌的患病程度也越严重 (图 2-5)。以上数据表明病原菌分生孢子对羊肚菌子实体的最低致病浓度为 1×10^3 个/mL。



图 2-5 病原菌分生孢子浓度对羊肚菌子实体患病的影响

Fig.2-5 Effect of conidial concentration on fruiting body disease of Morchella

感染第三天 A: 对照; B-G: 病原菌接种浓度依次为: 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 个/mL

2.4.4 患病羊肚菌子实体疾病发展进程

对不同感染时期的羊肚菌子囊果进行形态观察, 发现该病原菌定殖于羊肚菌菌盖上, 前期菌丝主要延羊肚菌纵褶和横褶蔓延, 形成羽毛状的病斑。随着感染天数的增加, 附着于羊肚菌菌盖上的白色菌丝逐渐浓密, 逐渐扩展为致密的白绒状病斑, 且不断向内及四周扩散, 侵染面积逐渐增大, 被附着的羊肚菌菌肉逐渐萎缩, 最终致使羊肚菌菌盖塌陷穿孔形成空洞 (图 2-6)。该病原菌不会导致整株羊肚菌的死亡, 从感染到观察试验结束, 羊肚菌依然可以正常生长。在羊肚菌子实体石蜡组织切片观察中发现, 正常羊肚菌组织边缘界限清晰、组织紧密、没有

缺损（图 2-7A），感染第 3 天，羊肚菌外缘组织变得松散无序有少许空洞，中间髓样组织枯萎皱缩（图 2-7B）。感染第 6 天，外缘组织已丧失正常羊肚菌组织形态，组织间出现大量空洞，中间髓样组织几乎消失，整体呈膨胀状态（图 2-7C）。感染第 9 天，羊肚菌组织形态已完全消失（图 2-7D），在这里由于技术的限制，无法确认该组织是羊肚菌组织皱缩而成，还是被病原菌菌丝所取代，因此还需要更进一步的研究。感染第 12 天，组织变得更加致密（图 2-7E）。将感染第 6 天的羊肚菌石蜡组织切片局部放大 400 倍，可以观察到患病羊肚菌组织内有子囊孢子的存在（图 2-7F），但是在正常羊肚菌中却没有观察到（图 2-7G），推测这可能是羊肚菌在病原菌的压力下，羊肚菌为保存种质而采取的防御措施，但这也不排除是由于采集的羊肚菌不是同一时期而造成的误差。

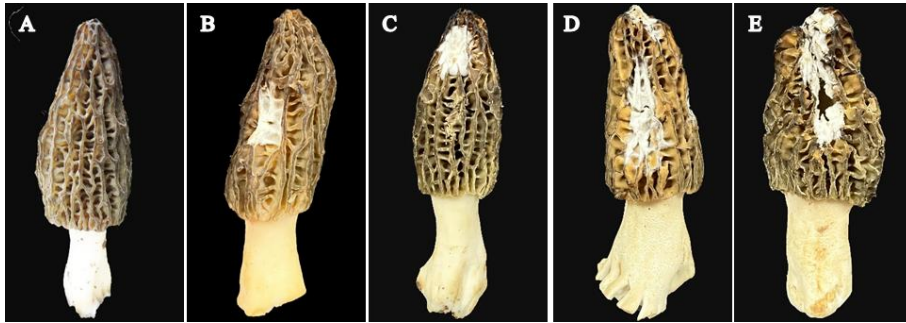


图 2-6 不同感染时期的羊肚菌子囊果形态

Fig.2-6 Morphology of Morchella fruiting body at different infection stages

A: 正常羊肚菌; B-E: 分别感染第 3、6、9、12 天

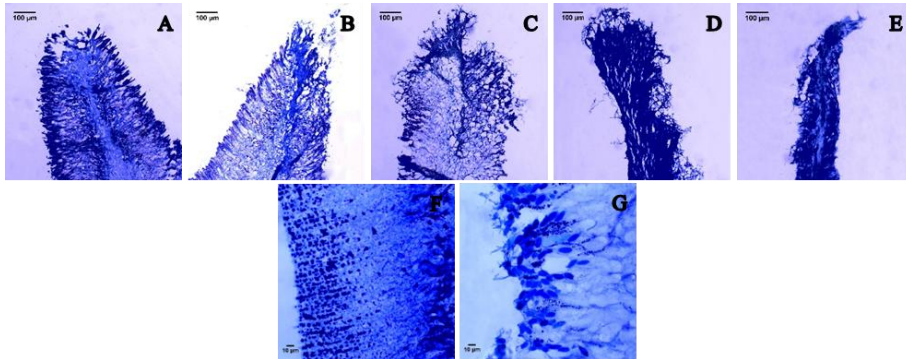


图 2-7 不同感染时期的羊肚菌子囊果石蜡组织切片形态

Fig.2-7 Morphology of paraffin sections of Morchella fruiting body at different infection stages

A: 正常羊肚菌组织（100×）；B-E: 分别感染第 3、6、9、12 天的羊肚菌组织（100×）；F: 正常羊肚菌组织（400×）；G: 感染第 6 天的羊肚菌组织（400×）

2.5 小结与讨论

羊肚菌枯萎病在羊肚菌栽培过程中时常发生，可由多种病原菌引起，拟盘多毛孢可导致此种病害。对拟盘多毛孢引起的羊肚菌枯萎病发生情况进行调查，发现该病害主要发生于羊肚菌采收期温度较高的时间段，高温、高湿、空气不流通容易导致该病害发生。进一步对该病原菌进行种属鉴定，综合其菌落及分生孢子

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/868031051025006045>