

防治卵孢小奥德蘑蛛网病生防菌筛选及其基因组分析

刘亚勇¹, 张涛涛¹, 高琳¹, 赵娟¹, 孟盼盼^{1,2}, 李莹菲¹, 秦文韬^{1*}

1 北京市农林科学院植物保护研究所, 农业农村部北方果蔬有害生物绿色防控重点实验室(部省共建), 北京

2 河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定

刘亚勇, 张涛涛, 高琳, 赵娟, 孟盼盼, 李莹菲, 秦文韬. 防治卵孢小奥德蘑蛛网病生防菌筛选及其基因组分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 758-770.

LIU Yayong, ZHANG Taotao, GAO Lin, ZHAO Juan, MENG Panpan, LI Yingfei, QIN Wentao. Screening and genomic analysis of biocontrol bacteria against cobweb disease of *Oudemansiella raphanipes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 758-770.

摘要: 卵孢小奥德蘑(*Oudemansiella raphanipes*)是一种食药兼用的珍稀食用菌,但其易受到异形枝孢霉(*Cladobotryum varium*)引起的蛛网病侵害。【目的】获得能够生物防控蛛网病且促进卵孢小奥德蘑生长的覆土细菌。【方法】从卵孢小奥德蘑覆土中分离细菌,检测其对卵孢小奥德蘑及蛛网病菌的拮抗活性,筛选出具有防病促生的多功能菌株,并基于基因组数据分析明确其潜在的生物机制。【结果】从覆土中共分离获得90株细菌,其中38株细菌对异形枝孢霉具有明显的抑制活性,且对卵孢小奥德蘑无抑制活性。进一步筛选发现,2株细菌的上清液不仅显著促进卵孢小奥德蘑菌丝的生长,还能显著抑制异形枝孢霉菌丝的生长。基于基因组数据分析,鉴定出上述2株细菌分别为简单近芽孢杆菌(*Peribacillus simplex*)与根际苍白杆菌(*Ochrobactrum rhizosphaerae*),且它们含有多种功能基因与次级代谢产物基因簇。【结论】本研究获得2株具有食用菌防病促生功能的细菌,为未来蛛网病的生态防控储备了有益微生物资源。

关键词: 卵孢小奥德蘑; 覆土; 蛛网病; 异形枝孢霉; 生物防控

资助项目: 北京市自然科学基金(6232009); 北京市科技计划(Z231100003723001); 北京市农林科学院创新能力建设专项(KJCX20230115)

This work was supported by the Beijing Natural Science Foundation (6232009), the Beijing Science and Technology Program (Z231100003723001), and the Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences Innovation Capacity Building Special Funding Project (KJCX20230115).

*Corresponding author. E-mail: qinwentao@baafs.net.cn

Received: 2024-09-26; Accepted: 2024-11-21; Published online: 2024-12-17

Screening and genomic analysis of biocontrol bacteria against cobweb disease of *Oudemansiella raphanipes*

LIU Yayong¹, ZHANG Taotao¹, GAO Lin¹, ZHAO Juan¹, MENG Panpan^{1,2}, LI Yingfei¹, QIN Wentao^{1*}

1 Key Laboratory of Environment Friendly Management on Fruit and Vegetable Pests in North China (Co-construction by Ministry and Province), Institute of Plant Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing, China

2 College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei, China

Abstract: *Oudemansiella raphanipes* is a rare edible and medicinal mushroom, while it is highly susceptible to cobweb disease caused by *Cladobotryum varium*. **[Objective]** To obtain bacteria capable of controlling cobweb disease and promoting the mycelial growth of *O. raphanipes* from casing soil. **[Methods]** Bacteria were isolated from the casing soil of *O. raphanipes*, and their antagonistic activity against the mycelial growth of both *O. raphanipes* and *C. varium* was evaluated. The strains with disease-preventing and growth-promoting properties were screened out, and their functioning mechanisms were studied based on genome data. **[Results]** A total of 90 bacterial strains were isolated from the casing soil, of which 38 strains showed significant inhibitory activity against the mycelial growth of *C. varium* and no inhibitory activity against that of *O. raphanipes*. The supernatants of two strains significantly inhibited the mycelial growth of *C. varium* and promoted that of *O. raphanipes*. Based on the genome data, the above two strains were identified as *Peribacillus simplex* and *Ochrobactrum rhizosphaerae*, respectively, and they carried multiple functional genes and biosynthetic gene clusters of secondary metabolites. **[Conclusion]** Two bacterial strains capable of controlling the disease and promoting the growth of edible fungi were obtained, providing valuable microbial resources for the future biocontrol of cobweb disease.

Keywords: *Oudemansiella raphanipes*; casing soil; cobweb disease; *Cladobotryum varium*; biocontrol

卵孢小奥德蘑(*Oudemansiella raphanipes*), 俗称黑皮鸡枞, 在全球热带和亚热带地区广泛分布, 我国主要分布于云、贵、川等地^[1]。卵孢小奥德蘑以其鲜嫩醇香的口感和独特的风味而闻名, 富含多种氨基酸、多糖及微量元素^[2-3], 其子实体和发酵液中含有多糖、酶类、邻苯二酚、麦角甾醇、三萜类等活性化合物, 在抗氧化、抗肿瘤、免疫调节和肝脏保护等方面发挥积极作用^[4-5]。近年来, 随着大健康理论、大食

物观的提出, 卵孢小奥德蘑作为食药兼用的高档保健珍稀菌类, 在国内外市场上产品供不应求, 发展前景广阔。

蛛网病是影响食用菌产业健康发展的重要病害之一, 其病原菌为枝孢霉属(*Cladobotryum*)真菌^[6]。不同种类枝孢霉会导致双孢菇、香菇、金针菇、卵孢小奥德蘑等食用菌发生蛛网病, 侵染初期菌柄基部出现白色稀疏菌丝并逐渐蔓延, 后期白色絮状菌丝覆盖菇体, 导致其腐烂

或萎缩^[7-8]。课题组前期在北京地区发现了卵孢小奥德蘑蛛网病，并明确其病原菌为异形枝孢霉(*C. varium*)，其发病率高达 25%，给种植户造成了巨大的经济损失^[9-10]。目前，该病害的致病机理尚不明确，国内外主要通过棚室消毒预防，发病后则多依赖苯菌酮、咪鲜胺等化学药剂^[11-12]，但缺乏选择性强、安全高效的防治措施。卵孢小奥德蘑作为绿色、健康食品，其独特的生产方式及较短的生长周期决定了不宜在子实体生长阶段施用化学药剂。近年来，生物防治以其绿色、环保、无残留等特点备受瞩目，其可有效抑制多种植物和食用菌的病原菌。例如，安全高效的生防菌贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)已被证实可有效抑制双孢菇蛛网病菌嗜菌枝孢霉(*C. mycophilum*)^[13]。然而，关于卵孢小奥德蘑蛛网病的生物防治研究尚未见报道。

覆土是卵孢小奥德蘑栽培中的关键环节，其覆土中蕴含着丰富的有益细菌，构成了潜在的生防菌资源库^[14-15]。许多微生物具有溶磷、解钾、固氮或产生生长激素、嗜铁素等生物活性物质的功能，能通过自身生理生化代谢活动参与营养物质和能量的循环转化，进而影响卵孢小奥德蘑原基形成和子实体分化^[16]。研究表明，食用菌覆土中的有益菌可以通过分泌抗菌物质抑制病原菌的生长、分解土壤中的有害物质，或与特定的病原菌竞争营养和空间等，从而减少食用菌病原菌的数量，并诱导其子实体的形成，进而提高产量^[17]。然而，目前尚不清楚覆土中的微生物是否具备拮抗卵孢小奥德蘑蛛网病菌的活性。

本研究旨在从卵孢小奥德蘑覆土中筛选、鉴定具有拮抗蛛网病菌菌丝生长，同时能促进其自身菌丝生长的细菌，以储备覆土有益微生物资源，探究覆土微生物的挖掘潜力，为卵孢小奥德蘑蛛网病的科学绿色防控奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株及卵孢小奥德蘑覆土

供试卵孢小奥德蘑菌株 HPJZ 和异形枝孢霉菌株 JZBQA1 均为课题组前期分离保存^[7]。覆土采集于北京通州的卵孢小奥德蘑种植基地，为出菇期覆土。

1.1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0。

LB 固体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 15.0。

LB 液体培养基: LB 粉末 39.0 g/L, 去离子水定容至 1 000 mL。

PDA 综合培养基: 去皮土豆 200 g/L 煮熟取滤液, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, 磷酸二氢钾 3 g/L, 无水硫酸镁 1.5 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 维生素 B₁ 10 mg/L, 去离子水定容至 1 000 mL。

1.2 覆土细菌的分离

取 3 g 土壤加 45 mL 无菌水制成土壤悬浮液，置于 25 °C、160 r/min 培养过夜，将土壤悬浮液稀释至 10⁻³，并取 200 μL 均匀涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上，每份土壤悬浮液稀释液设置 6 个重复，根据不同菌落形态使用无菌牙签挑取单菌落至新的 LB 固体培养基上进行划线分离培养，获得细菌的纯培养菌株后，使用无菌枪头蘸取纯培养菌株置于装有 3 mL LB 液体培养基的无菌 10 mL 离心管中，25 °C、160 r/m 培养至 OD₆₀₀ 为 1.5，保存于灭菌的 30% 甘油内。

1.3 覆土细菌的初步鉴定

将 500 μL 细菌菌液进行沸水浴 5 min 灭活，并以此作为 DNA 模板，使用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3')

进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): DNA 模板 4 μ L, 2 \times PCR Mix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, ddH₂O 17 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 5 μ L PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 将合格 PCR 产物送至北京诺赛基因组研究中心测序。测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对。

1.4 卵孢小奥德蘑蛛网病菌拮抗细菌的筛选

1.4.1 覆土细菌菌体对卵孢小奥德蘑及其蛛网病菌菌丝生长的作用评价

利用打孔器制作直径为 10 mm 的卵孢小奥德蘑/蛛网病菌接种块, 将其接种至 PDA 平板中央(每个平板含有 15 mL PDA 培养基), 25 $^{\circ}$ C 恒温培养。取 500 μ L 细菌菌液接种到 3 mL LB 液体培养基的离心管中, 25 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养, 定期测量 OD_{600} 至其达到 1.5, 将菌液转至 1.5 mL 离心管中备用。待卵孢小奥德蘑/蛛网病菌菌落生长至直径 3 cm 时, 使用无菌枪头蘸取细菌菌液在平板直径左右两端距菌落 1.5 cm 的位置划两条直线。每株细菌设置 3 个重复。以同等条件下蘸取 LB 液体培养基划线作为对照组, 以同等条件下不做处理的平板作为空白对照。观察菌落生长情况, 记录卵孢小奥德蘑/蛛网病菌菌落直径, 计算抑菌率。抑菌率的计算如公式(1)所示。

$$X=(A_0-A_1)/A_0\times 100\% \quad (1)$$

式中: X 为抑菌率; A_0 为对照菌落直径(mm); A_1 为处理菌落直径(mm)。

1.4.2 细菌上清液对卵孢小奥德蘑及其蛛网病菌菌丝生长的作用评价

取 3 mL 细菌菌液(OD_{600} 为 1.5)加入装有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶内,

25 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 2 d, 之后 8 000 r/min 离心 10 min, 然后用 0.22 μ m 除菌过滤器获得无菌上清液。取 4 mL 滤液加入到 16 mL PDA 培养基中。用直径为 10 mm 的打孔器获得相同接种量的卵孢小奥德蘑/蛛网病菌菌丝块, 接种至平板中央。每隔 24 h 划线并记录卵孢小奥德蘑及其蛛网病菌菌丝的生长速度, 直至菌丝长满平板。菌丝生长速度(V , mm/d)的计算如公式(2)所示。

$$V=[(D_2-D_1)/d] \quad (2)$$

式中: D_1 为第 1 次测量的直径(mm); D_2 为最后一次测量的直径(mm); d 为测量天数。

同时, 挑取平板上卵孢小奥德蘑及其蛛网病菌的菌丝, 制成切片后通过 ECLIPSE LV100ND 显微镜(Nikon 公司)观察, 采用 NIS-Elements 显微成像软件拍照。

1.5 卵孢小奥德蘑蛛网病菌拮抗细菌的生理生化及基因组分析

覆土细菌菌株以平板划线法接种到 LB 固体培养基上, 25 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 观察并拍照记录菌落形态。挑取菌体利用革兰氏染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)进行革兰氏染色, 并通过显微镜观察拍照。将菌液与 Salkowski 试剂(由 0.5 mol/L FeCl₃ 和 35% 高氯酸组成)混合, 在黑暗处放置一段时间后观察溶液颜色变化, 分析细菌产生植物激素吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)的情况。

采用细菌 DNA 提取试剂盒(TaKaRa 公司)对细菌 DNA 进行提取, 构建细菌基因组文库, 利用 Illumina 测序平台进行测序, 并采用从头测序组装(*de novo* 测序组装)。基因组数据已保存于国家微生物科学数据中心(NMDC, <http://nmdc.cn>), 数据编号分别为 NMDC60197572 和 NMDC60197573。对于细菌基因组, 利用 MAFFT 进行序列比对, 同时采用最大似然法

(maximum-likelihood), 利用 autoMLST 网站 (<https://automl.st.ziemertlab.com>) 根据基因组中的 60 个核心基因构建系统发育树, 且设置重复检验次数为 1 000 次循环, 以计算自展值 (bootstrap value, BP)。利用 antiSMASH 分析细菌基因组含有的次级代谢产物基因簇, 采用生物信息软件 Anvi'o v8 进行细菌泛基因组分析。

1.6 数据统计

分别使用 GraphPad Prism 8.0 和 OriginPro 2021 软件分析数据和绘图。采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验组间差异。显著性差异的定义为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 卵孢小奥德蘑覆土中细菌的分离及初步鉴定

从覆土中分离、筛选并保藏不同菌落形态的细菌, 共计 90 株细菌。通过 16S rRNA 基因序列的初步鉴定, 它们分别来自于芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、微杆菌

属 (*Microbacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*) 等 (图 1), 其中芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 占比较多 (45%)。

2.2 覆土细菌对卵孢小奥德蘑及异形枝霉菌生长的影响

通过平板对峙培养法检测了 90 株细菌对卵孢小奥德蘑菌丝生长的影响, 结果显示其中 65 株细菌对卵孢小奥德蘑菌丝生长无明显抑制活性, 25 株细菌对卵孢小奥德蘑菌丝生长具有不同程度的抑制作用。卵孢小奥德蘑的菌落直径为 36.0–69.2 mm, 抑菌率为 23.1%–60.0%。如图 2 所示, *Bacillus* sp. 11-36 和 *Pseudomonas* sp. 55-10 对卵孢小奥德蘑菌丝生长的抑菌率分别达到 60.0% 和 50.0%, 而金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*) 菌株 26-1 对卵孢小奥德蘑生长的抑菌率仅为 2.9%, 但对异形枝霉菌有很强的抑制活性, 抑菌率为 51.4%。

为获得抑制蛛网病菌生长但不影响卵孢小奥德蘑生长的功能细菌, 以对卵孢小奥德蘑无明显抑制作用的 65 株细菌为研究对象, 检测其

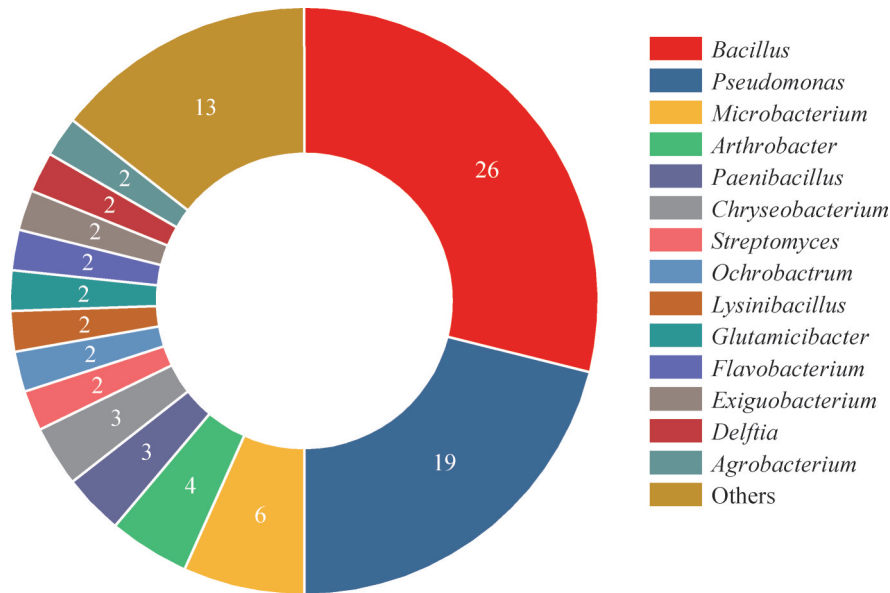


图1 卵孢小奥德蘑覆土中分离获得的细菌属水平组成

Figure 1 The composition of the isolated bacteria in casing soil of *Oudemansiella raphanipes* at the genus level.

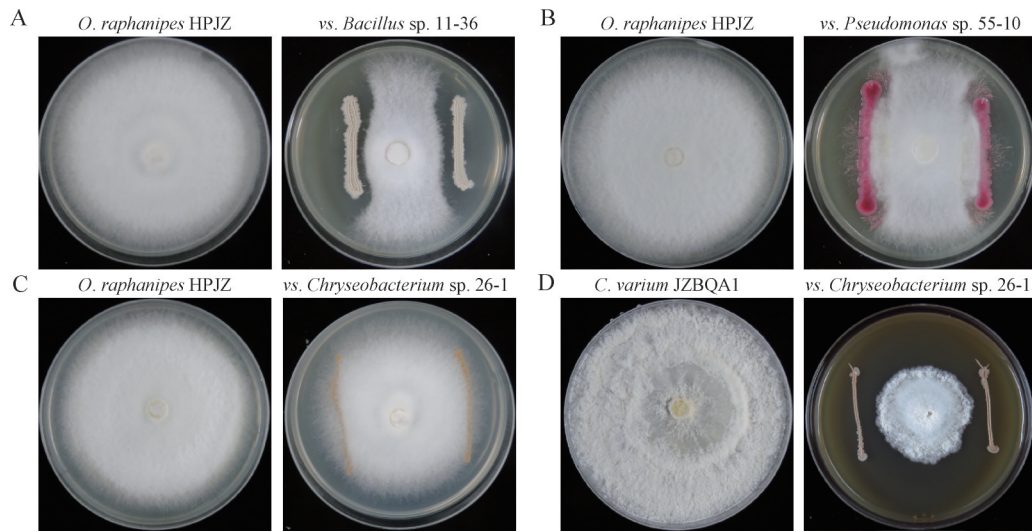


图2 覆土细菌对卵孢小奥德蘑及其蛛网病菌异形枝葡霉的抑制作用。A: 芽孢杆菌11-36对卵孢小奥德蘑HPJZ的抑制作用; B: 假单胞菌55-10对于卵孢小奥德蘑HPJZ的抑制作用; C: 金黄杆菌26-1对卵孢小奥德蘑HPJZ的抑制作用; D: 金黄杆菌26-1对异形枝葡霉菌JZBQA1的抑制作用。

Figure 2 Inhibitory effect of bacteria in casing soil on the mycelial growth of *Oudemansiella raphanipes* and *Cladobotryum varium*. A: Antagonism of *Bacillus* sp. 11-36 on mycelial growth of *O. raphanipes* HPJZ; B: Antagonism of *Pseudomonas* sp. 55-10 on mycelial growth of *O. raphanipes* HPJZ; C: Antagonism of *Chryseobacterium* sp. 26-1 on mycelial growth of *O. raphanipes* HPJZ; D: Antagonism of *Chryseobacterium* sp. 26-1 against mycelial growth of *C. varium* JZBQA1.

对异形枝葡霉菌丝生长的活性。对峙培养发现, 其中的 38 株细菌抑制异形枝葡霉菌丝的生长, 菌落直径范围为 34.2–62.0 mm, 抑菌率为 31.1%–62.0% (图 3)。38 株细菌对异形枝葡霉菌的抑制率大于 31.0%, 这些潜在功能细菌种类丰富, 分别属于假单胞菌属(7 株)、芽孢杆菌属(6 株)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*) (2 株) 等 21 个属。

2.3 覆土细菌上清液对卵孢小奥德蘑及蛛网病菌生长的影响

在上述研究的基础上, 为进一步筛选覆土内促进卵孢小奥德蘑菌丝生长的菌株, 检测了上述 38 株细菌的发酵上清液对卵孢小奥德蘑菌丝生长的影响。结果显示, 5 株细菌具有显著促进卵孢小奥德蘑菌丝生长的活性(图 4A), 分别为菌株 4-7、52-32、10-18、27-12 和 6-22。同

时, 检测了 38 株细菌的上清液对异形枝葡霉菌丝生长的影响, 结果发现 26 株细菌具有显著抑制异形枝葡霉菌的活性(图 4B), 这些菌株可成为卵孢小奥德蘑蛛网病的重要生防菌株资源。其中, 2 株细菌(27-12 和 6-22)对卵孢小奥德蘑菌丝生长具有显著的促生长作用, 同时对异形枝葡霉菌丝生长具有显著的抑制作用。菌丝显微形态观察显示, 2 株菌对卵孢小奥德蘑菌丝无明显影响, 但菌株 6-22 的上清液导致异形枝葡霉菌丝变形、破裂, 形成明显的空泡(图 4C); 而菌株 27-12 的发酵上清液则能抑制异形枝葡霉菌丝的生长, 并使其菌丝表面呈现凹凸不平的现象(图 4C)。

2.4 潜在生防菌株的鉴定及基因组分析

菌株 6-22 的菌落近圆形, 乳白色, 边缘整齐, 不透明, 表面光滑呈油性, 可产生 IAA,

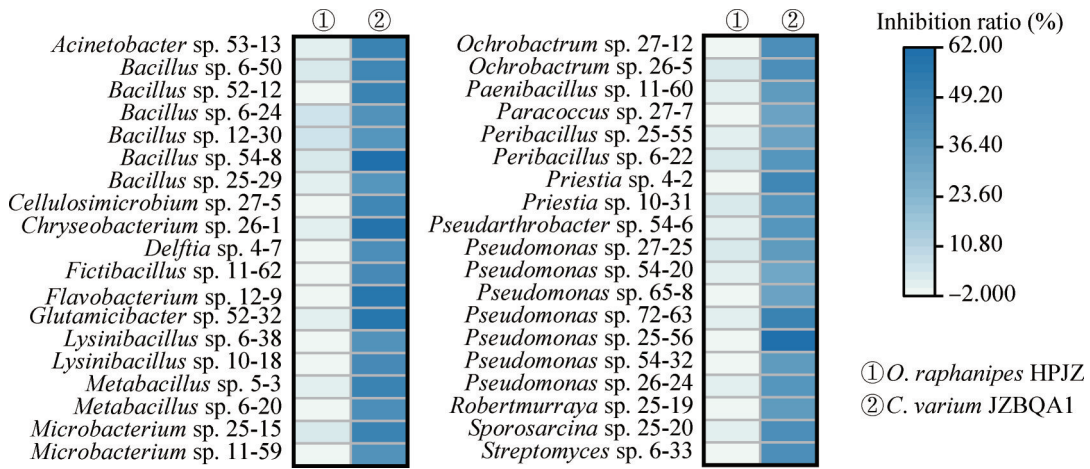
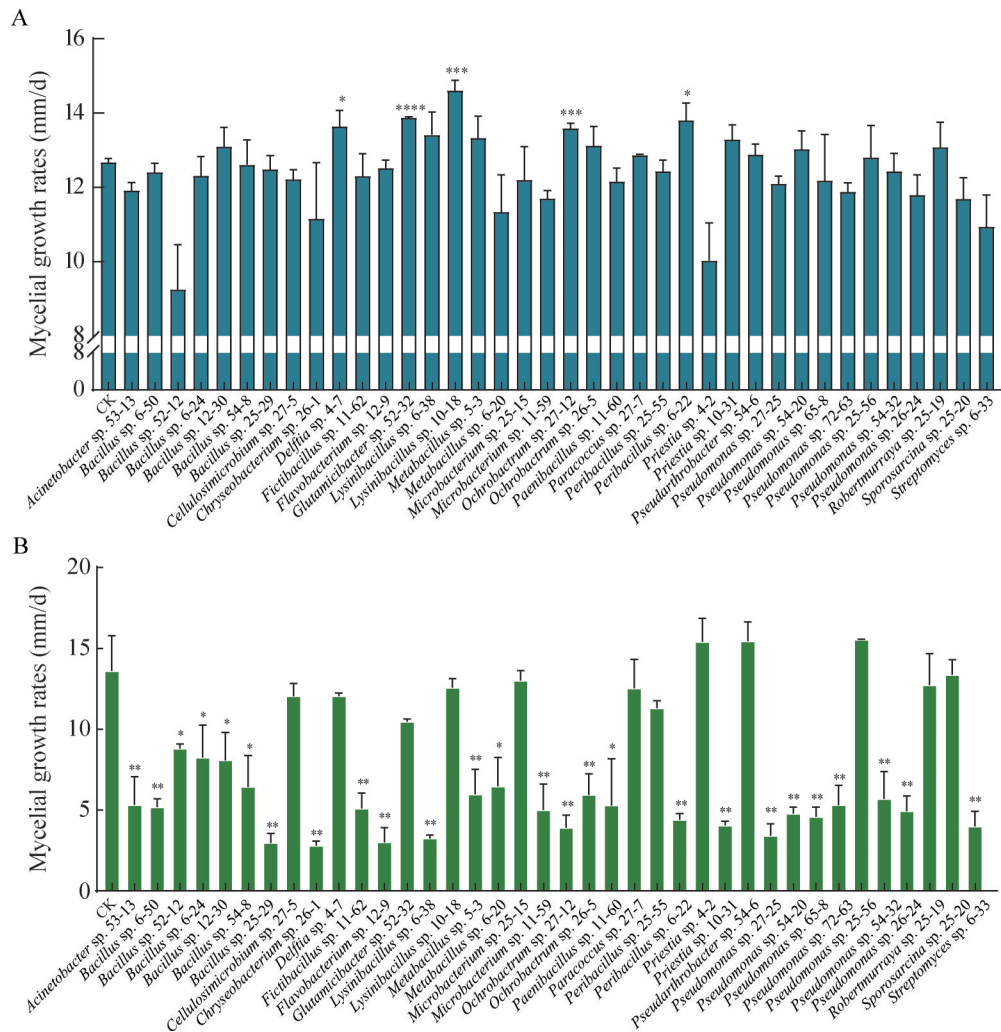


图3 覆土细菌对卵孢小奥德蘑和异形枝孢霉菌丝生长的抑制作用

Figure 3 Inhibition of the bacteria in casing soil on the mycelial growth of *Oudemansiella raphanipes* and *Cladobotryum varium*.



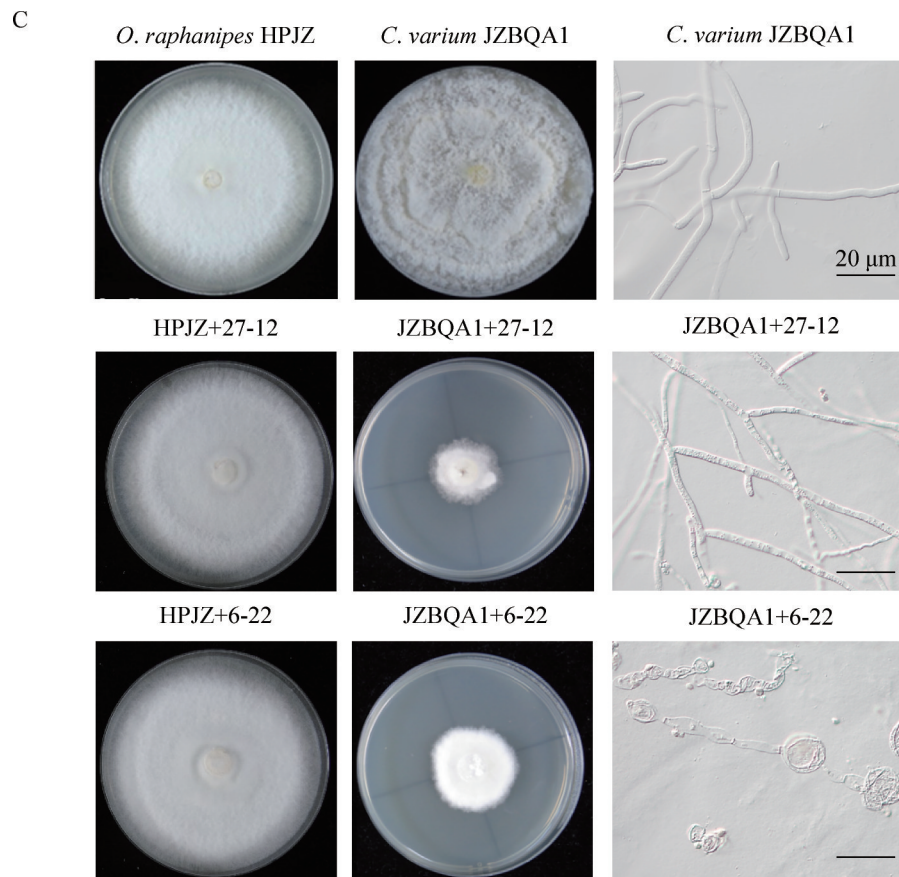


图4 覆土细菌上清液对卵孢小奥德蘑和异形枝葡萄霉菌丝生长的影响。A: 上清液对卵孢小奥德蘑菌丝生长的影响(*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$); B: 上清液对异形枝葡萄霉菌丝生长的影响(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$); C: 菌株6-22和27-12的上清液对卵孢小奥德蘑和异形枝葡萄霉菌丝生长的影响。

Figure 4 Effect of supernatant of bacteria in casing soil on the mycelial growth of *Oudemansiella raphanipes* and *Cladobotryum varium*. A: Effect of supernatant on the mycelial growth of *O. raphanipes* (*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$); B: Effect of supernatant on the mycelial growth of *C. varium* (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$); C: Effect of supernatant of strains 6-22 and 27-12 on the mycelial growth of *O. raphanipes* and *C. varium*.

革兰氏染色显示为革兰氏阳性菌。菌株 6-22 基因组与简单近芽孢杆菌 (*Peribacillus simplex*) BA2H3 基因组平均核苷酸同一性 (average nucleotide identity, ANI) 相似性达 98.4%，系统发育树分析显示，二者也聚类在一起 [maximum likelihood bootstrap (MLBP)=100%]，综合形态学特征、生理生化特性和系统发育分析结果，鉴定菌株 6-22 为简单近芽孢杆菌。进一步基因组 antiSMASH 分析结果显示，菌株 6-22 含有

10 个生物合成基因簇 (biosynthetic gene clusters, BGCs)，这些基因簇包括非核糖体肽 (non-ribosomal peptides, NRPs)、III 型聚酮合酶 (type III polyketide synthases, T3PKS)、萜烯类 (terpene)、套索肽 (lasso peptide)、铁载体 (NI-siderophore)、含唑线性肽 [linear azol(in)e-containing peptide, LAP]、 β -内酯 (betalactone)。通过序列比对分析，结果显示菌株 6-22 中的套索肽基因簇 BGC-1.2 与已知的 paeninodin 基因

簇具有 100% 的相似性，铁载体基因簇 BGC-4.1 与 schizokinen 基因簇具有 75% 的相似性，非核糖体肽基因簇 BGC-5.1 与 koranimine 基因簇具有 75% 的相似性。其余 BGCs 则未找到与已知次级代谢产物的相似性，这表明菌株 6-22 可能含有 7 个新的次级代谢产物基因簇。泛基因组分析显示，菌株 6-22 含有 8 个 IAA 产生相关基因，9 个溶磷功能相关基因，7 个固氮相关基因以及铁载体基因(图 5)。

菌株 27-12 的菌落近圆形，乳白色，边缘整齐，不透明，表面光滑呈油性，微弱的 IAA 产生能力，为革兰氏阴性菌。菌株 27-12 基因组与根际苍白杆菌(*Ochrobactrum rhizosphaerae*) SJY1 基因组 ANI 相似性达 97.0%，且系统发育树上与该菌株聚类在一个分支(MLBP=100%)，综合形态学特征、生理生化特性和系统发育分析结

果鉴定菌株 27-12 为根际苍白杆菌。进一步基因组 antiSMASH 分析结果显示，菌株 27-12 含有 9 个 BGCs，包括萜烯类、 β -内酯、氰化氢(hydrogen-cyanide)、芳基多烯类化合物(arylpolyene)等。序列比对发现 9 个 BGCs 均未找到序列相似的已知次级代谢产物，因而初步判定菌株 27-12 含有的 9 个 BGCs 为新的次级代谢产物基因簇。泛基因组分析显示，菌株 27-12 含有 9 个 IAA 产生相关基因，6 个溶磷功能相关基因，3 个固氮相关基因(图 6)。

3 讨论与结论

覆土是卵孢小奥德蘑栽培过程中至关重要的步骤，覆土中栖居着的微生物种类繁多，功能复杂，对食用菌菌丝的生长、子实体的分化和发育具有重要作用，影响其产量和出菇整齐

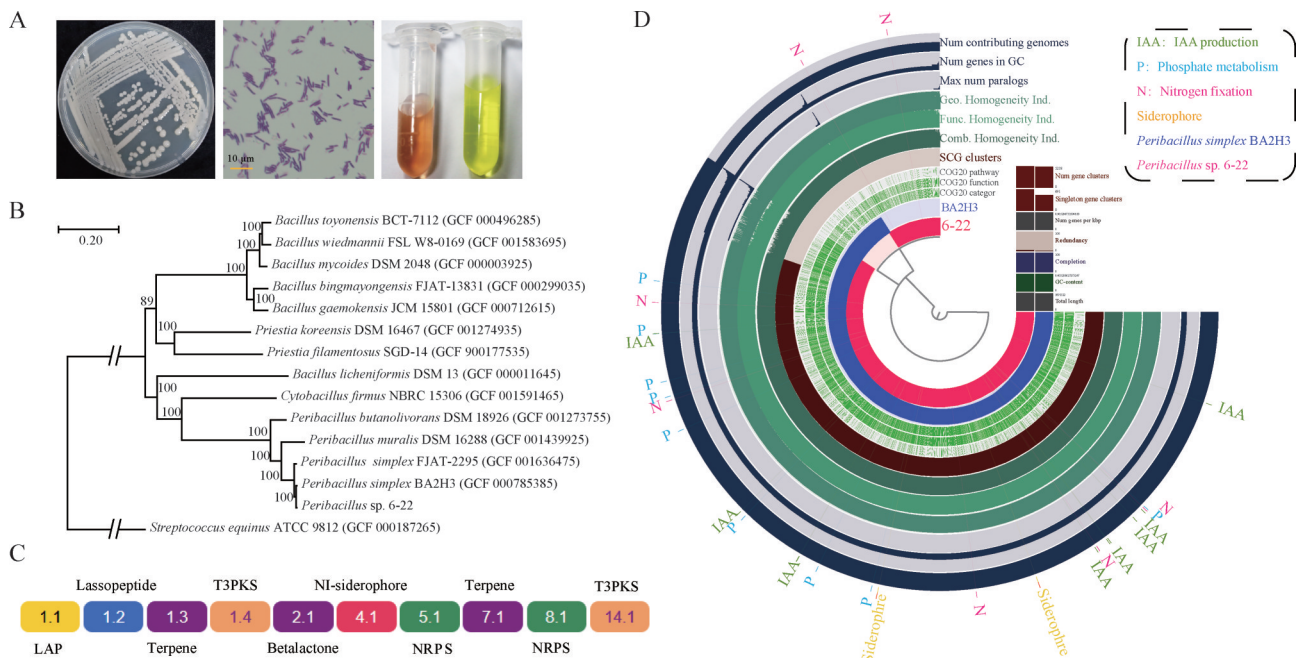


图5 菌株6-22系统发育树及基因组分析。A: 菌落形态、革兰氏染色及IAA活性检测；B: 系统发育树分析；C: 次级代谢产物合成基因簇；D: 泛基因组分析。

Figure 5 Phylogenetic tree and genome analysis of strain 6-22. A: Colony morphology, Gram staining, and IAA activity detection; B: Phylogenetic tree analysis; C: Secondary metabolite biosynthesis gene clusters; D: Pangenome analysis.

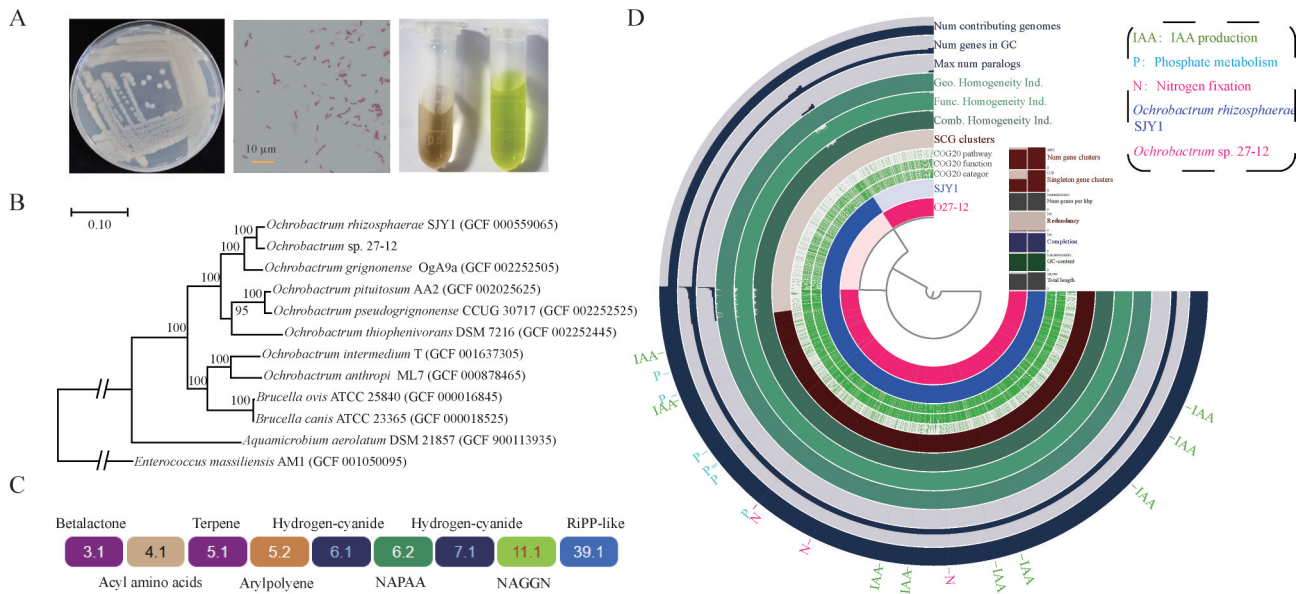


图6 菌株27-12系统发育树及基因组分析。A: 菌落形态、革兰氏染色及IAA活性检测；B: 系统发育树分析；C: 次级代谢产物合成基因簇；D: 泛基因组分析。

Figure 6 Phylogenetic tree and genome analysis of strain 27-12. A: Colony morphology, Gram staining, and IAA activity detection; B: Phylogenetic tree analysis; C: Secondary metabolite biosynthesis gene clusters; D: Pangenome analysis.

度等特性^[18]。本研究团队前期发现，卵孢小奥德蘑覆土中微生物极其丰富，主要分布于放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)等，相对丰度大于1%的属超过37个^[15]，包含了本研究分离到的芽孢杆菌属、假单胞菌属、微杆菌属、节杆菌属等多个属，这也进一步表明了卵孢小奥德蘑覆土中含有丰富的微生物资源尚待挖掘。

蛛网病作为食用菌常见的病害之一，目前仍缺乏绿色、安全且具有针对性的生物防控方法。蛛网病生防菌株应具备既不影响食用菌菌丝的正常生长，又能对病原菌表现出特异性的抑制活性。因此，那些具有广谱且强抑菌活性的细菌可能并不适宜合用于食用菌真菌病害的防控。例如，本研究发现 *Bacillus* sp. 11-36 和 *Pseudomonas* sp. 55-10 对卵孢小奥德蘑和蛛网病

菌均具有较强的抑制活性，但它们可能对卵孢小奥德蘑菌丝的生长阶段产生不利影响，因此不适合用于防治卵孢小奥德蘑蛛网病。Büchner 等研究表明，贝莱斯芽孢杆菌 SZMC 25431 具有防控双孢菇绿霉病的应用潜力^[19]，但该研究并未考虑生防菌对食用菌菌丝生长可能产生的影响。此外，覆土中可能存在能够促进食用菌生长的有益细菌。例如，平菇 (*Pleurotus ostreatus*)覆土中假单胞菌种群可增加促进子实体的形成及提高产量^[20]。同样，研究发现卵孢小奥德蘑种植后，覆土中链霉菌 (*Streptomyces*)和类诺卡氏菌(*Nocardioide*s)的相对丰度增加利于卵孢小奥德蘑菌丝的生长^[15,21]。本研究从覆土中筛选获得了2株具有双重功能的细菌，它们不仅能够拮抗蛛网病菌，还能促进卵孢小奥德蘑菌丝的生长。

基因组分析发现，潜在生防菌简单近芽孢

杆菌 6-22 和根际苍白杆菌 27-12 可产生丰富的次级代谢产物。近芽孢杆菌属(*Peribacillus*)是 2020 年从芽孢杆菌属中划分出的新属, 其特性与芽孢杆菌非常相近^[22]。芽孢杆菌可产生丰富的抗菌活性物质, 包括表面活性素(surfactin)、伊枯菌素(iturin)、芬芥素(fengycin)和杆菌溶素(bacilysin)等, 能有效抑制多种病原真菌的生长^[23]。AntiSMASH 分析结果显示, 菌株 6-22 的基因组中未预测到常见的抗真菌活性基因簇, 如伊枯菌素和芬芥素, 但发现了新的 β -内酯、NRPs、PKS 等次级代谢产物基因簇。这些新的次级代谢产物可能具有抗真菌活性, 如 β -内酯类物质 alligamycin A 可抑制曲霉(*Aspergillus*)^[24], 大肠杆菌产生的铁载体可抑制构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的生长^[25], NRPs 类活性产物在芽孢杆菌与类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)抗真菌活性中发挥重要作用^[26]。由此, 推断菌株 6-22 对异形枝葡萄霉的抑制作用可能源于 β -内酯、铁载体及非核糖体肽等多种活性物质的协同作用。Allioui 等研究表明, 简单近芽孢杆菌具有抑制多种真菌的活性, 如简单近芽孢杆菌 Alg. 24B2 可抑制小麦叶枯病菌(*Zymoseptoria tritici*)菌丝的生长^[27], 简单近芽孢杆菌 PHYB1 和 PHYB9 两株菌能够抑制弯角镰孢菌(*F. camptoceras*), 有效地防治黑种草根腐病^[28]。然而, 其抗真菌活性的代谢产物仍需进一步研究。目前, 根际苍白杆菌具有抗真菌活性的报道极少, 本研究中根际苍白杆菌 27-12 含有多个新的 BGCs, 包括 β -内酯、酰基氨基酸(acyl amino acids)。Fait 等^[29]研究表明, 酰基氨基酸类似表面活性剂具有抗真菌活性, 根据菌株 27-12 所含的 BGCs 推断, 可能是由 β -内酯、酰基氨基酸等次级代谢产物发挥抗真菌活性。上述 2 株细菌的次级代谢产物仍有待进一步研究。一些芽孢杆菌可促进食用菌的生长, 如蜡状芽孢杆菌

(*B. cereus*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)等^[30-31]。苍白杆菌也是一类重要的植物促生长功能菌, 具有溶磷、产生 IAA 等活性^[32-33]。本研究发现, 简单芽孢杆菌菌株 6-22 可产生 IAA, 且基因组数据显示菌株 6-22 和 27-12 的基因组中含有丰富的溶磷、固氮相关功能基因, 此结果与 2 株菌可促进卵孢小奥德蘑菌丝生长一致。

本研究成功筛选出 2 株针对卵孢小奥德蘑蛛网病的潜在生防菌, 这些菌株不仅能有效抑制蛛网病菌菌丝的生长, 同时还能促进卵孢小奥德蘑菌丝的生长。因此, 它们具有巨大的应用潜力, 可作为卵孢小奥德蘑蛛网病的生物防治菌剂进行开发。本研究的结果为未来蛛网病的生态防控提供了宝贵的微生物资源。

作者贡献声明

刘亚勇: 数据收集与处理, 论文撰写; 张涛涛: 微生物分离培养; 高琳: 微生物分离及鉴定; 赵娟: 课题讨论, 论文修改; 孟盼盼: 微生物基因组测序; 李莹菲: 微生物分离培养; 秦文韬: 课题设计, 实验指导, 论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] HAO YJ, ZHAO Q, WANG SX, YANG ZL. What is the radicate *Oudemansiella* cultivated in China?[J]. *Phytotaxa*, 2016, 286(1): 1.
- [2] 卢彩会, 郭晓萌, 牟德华. 黑皮鸡枞菌水提物和醇提物的主要成分及抗氧化性研究[J]. *食品工程*, 2016(3): 35-40, 57.
- [3] LU CH, GUO XM, MOU DH. Research of composition and antioxidant activity between water and alcohol extracts of black *Termitomyces albuminosus*[J]. *Food Engineering*, 2016(3): 35-40, 57 (in Chinese).
- [3] 郭艳芳. 卵孢小奥德蘑子实体的化学成分及其生物活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2019.
- GUO YF. Analysis of chemical components and biological activities derived from fruiting body of

- Oudemansiella raphanipes*[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [4] 杜娜, 胡惠萍, 谢意珍, 雍天乔, 莫伟鹏, 梁晓薇, 卓丽君. 卵孢小奥德蘑的研究进展[J]. 中国食用菌, 2020, 39(10): 1-5, 10.
DU N, HU HP, XIE YZ, YONG TQ, MO WP, LIANG XW, ZHUO LJ. Research progress on *Oudemansiella raphanipes*[J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(10): 1-5, 10 (in Chinese).
- [5] GAO Z, ZHANG C, LIU H, ZHU YF, REN ZZ, JING HJ, LI SS, ZHANG JJ, LIU XT, JIA L. The characteristics and antioxidation of *Oudemansiella radicata* selenium polysaccharides on lipopolysaccharide-induced endo-toxic mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116: 753-764.
- [6] 秦文韬, 王守现, 荣成博, 宋忠娟, 刘宇. 我国食用菌病害发生与防控概况[J]. 中国食用菌, 2020, 39(12): 1-7.
QIN WT, WANG SX, RONG CB, SONG ZJ, LIU Y. Occurrence and management of edible fungus diseases in China[J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(12): 1-7 (in Chinese).
- [7] 李俊, 秦文韬, 曹子健, 刘宇, 赵娟, 王守现. 卵孢小奥德蘑蛛网病菌PCR检测方法的建立与应用[J]. 北方园艺, 2022(22): 124-131.
LI J, QIN WT, CAO ZJ, LIU Y, ZHAO J, WANG SX. Establishment and application of PCR detection methods for *Cladobotryum varium*[J]. Northern Horticulture, 2022(22): 124-131 (in Chinese).
- [8] CARRASCO J, MARÍA-JESÚS N, GEA FJ. Cobweb, a serious pathology in mushroom crops: a review[J]. Spanish Journal of Agricultural Research, 2017, 15: e10R01.
- [9] QIN W, LI J, ZENG Z, WANG S, GAO L, RONG C, GAO Q, LIU Y. First report of cobweb disease in *Oudemansiella raphanipes* caused by *Cladobotryum varium* in Beijing, China[J]. Plant Disease, 2021, 105(12): 4171.
- [10] 李俊, 秦文韬, 高琳, 刘宇, 王守现, 宋庆港. 卵孢小奥德蘑蛛网病菌病原菌的鉴定与生物学特性研究[J]. 植物保护, 2023, 49(3): 164-171.
LI J, QIN WT, GAO L, LIU Y, WANG SX, SONG QG. Identification and biological characteristics of *Hypomyces aurantius*, the pathogen of cobweb disease on *Oudemansiella raphanipes*[J]. Plant Protection, 2023, 49(3): 164-171 (in Chinese).
- [11] GROGAN HM. Fungicide control of mushroom cobweb disease caused by *Cladobotryum* strains with different benzimidazole resistance profiles[J]. Pest Management Science, 2006, 62(2): 153-161.
- [12] GEA FJ, NAVARRO MJ, SANTOS, DIANEZ F, HERRAIZ-PEÑALVER D. Screening and evaluation of essential oils from mediterranean aromatic plants against the mushroom cobweb disease, *Cladobotryum mycophilum*[J]. Agronomy, 2019, 9: 656.
- [13] CLARKE J, GROGAN H, FITZPATRICK D, KAVANAGH K. Analysis of the effect of *Bacillus velezensis* culture filtrate on the growth and proteome of *Cladobotryum mycophilum*[J]. Fungal Biology, 2022, 126(1): 11-19.
- [14] 秦文韬, 赵娟, 高琳, 王守现, 刘宇, 乔广行. 卵孢小奥德蘑覆土真菌群落特征及其影响因素[J]. 菌物学报, 2022, 41(9): 1458-1470.
QIN WT, ZHAO J, GAO L, WANG SX, LIU Y, QIAO GH. Characteristics and influencing factors of fungal community in the casing soil of cultivating *Oudemansiella raphanipes*[J]. Mycosystema, 2022, 41(9): 1458-1470 (in Chinese).
- [15] QIN WT, ZHAO J, LIU Y, GAO Q, SONG S, WANG SX, ZHANG B. Bacterial community shifts in casing soil before and after the cultivation of *Oudemansiella raphanipes*[J]. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2022, 22(4): 4116-4126.
- [16] 赵娟, 高晓珂, 郑惠千, 王守现, 刘宇, 秦文韬. 卵孢小奥德蘑覆土中有益细菌筛选与鉴定[J]. 食用菌学报, 2023, 30(6): 92-100.
ZHAO J, GAO XK, ZHENG HQ, WANG SX, LIU Y, QIN WT. Screening and identification of beneficial bacteria in casing soil of *Oudemansiella raphanipes*[J]. Acta Edulis Fungi, 2023, 30(6): 92-100 (in Chinese).
- [17] BÁNFI R, POHNER Z, SZABÓ A, HERCZEG G, KOVÁCS GM, NAGY A, MÁRIALIGETI K, VAJNA B. Succession and potential role of bacterial communities during *Pleurotus ostreatus* production[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2021, 97(10): fiab125.
- [18] 高琳, 王守现, 李俊亮, 刘志国, 刘宇, 秦文韬. 覆土材料对卵孢小奥德蘑出菇和产量的影响[J]. 北方园艺, 2022(18): 124-129.
GAO L, WANG SX, LI JL, LIU ZG, LIU Y, QIN WT. Effects of casing soil on fruiting and yield of *Oudemansiella raphanipes*[J]. Northern Horticulture, 2022(18): 124-129 (in Chinese).
- [19] BÜCHNER R, VÖRÖS M, ALLAGA H, VARGA A, BARTAL A, SZEKERES A, VARGA S, BAJZÁT J, BAKOS-BARCZI N, MISZ A, CSUTORÁS C, HATVANI L, VÁGVÖLGYI C, KREDICS L. Selection and characterization of a *Bacillus* strain for potential application in industrial production of white button mushroom (*Agaricus bisporus*)[J]. Agronomy, 2022, 12(2): 467.
- [20] CHO YS, WEON HY, JOH JH, LIM JH, KIM KY, SON ES, LEE CS, CHO BG. Effect of casing layer on growth promotion of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*[J]. Mycobiology, 2008, 36(1): 40-44.
- [21] WANG YJ, HUANG QQ, GAO H, ZHANG RQ, YANG L, GUO YR, LI HK, AWASTHI MK, LI GC. Long-term cover crops improved soil phosphorus availability in a rain-fed apple orchard[J]. Chemosphere, 2021, 275: 130093.
- [22] PATEL S, GUPTA RS. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(1): 406-438.
- [23] FIRA D, DIMKIĆ I, BERICĆ T, LOZO J, STANKOVIĆ S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species[J].

- Journal of Biotechnology, 2018, 285: 44-55.
- [24] YANG ZJ, QIAO YJ, STRØBECH E, MORTH JP, WALTHER G, JØRGENSEN TS, LUM KY, PESCHEL G, ROSENBAUM MA, PREVITALI V, CLAUSEN MH, LUKASSEN MV, GOTFREDSEN CH, KURZAI O, WEBER T, DING L. Alligamycin A, an antifungal β -lactone spiroketal macrolide from *Streptomyces iranensis*[J]. Nature Communications, 2024, 15: 9259.
- [25] KHAN A, SINGH P, KUMAR R, DAS S, SINGH RK, MINA U, AGRAWAL GK, RAKWAL R, SARKAR A, SRIVASTAVA A. Antifungal activity of siderophore isolated from *Escherichia coli* against *Aspergillus nidulans* via iron-mediated oxidative stress[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 729032.
- [26] GRADY EN, MACDONALD J, LIU L, RICHMAN A, YUAN ZC. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 203.
- [27] ALLIOUI N, DRISS F, DHOUB H, JLAIL L, TOUNSI S, FRIKHA-GARGOURI O. Two novel *Bacillus* strains (*subtilis* and *simplex* species) with promising potential for the biocontrol of *Zymoseptoria tritici*, the causal agent of *Septoria tritici* blotch of wheat[J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 6611657.
- [28] AL-SMAN KM, ABO-ELYOUSR K, ERAKY A, EL-ZAWAHRY A. Potential activities of *Bacillus simplex* as a biocontrol agent against root rot of *Nigella sativa* caused by *Fusarium camptoceras*[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2019, 29(1): 79.
- [29] FAIT ME, BAKAS L, GARROTE GL, MORCELLE SR, SAPARRAT MCN. Cationic surfactants as antifungal agents[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(1): 97-112.
- [30] SARI IJ, ARYANTHA INP. Screening and identification of mushrooms growth promoting bacteria on straw mushrooms (*Volvariella volvacea*)[J]. Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology, 2021, 6: 60618.
- [31] FEBRIANSYAH E, SASKIAWAN I, MANGUNWARDoyo W, SULISTİYANI TR, WIDHIYA EW. Potency of growth promoting bacteria on mycelial growth of edible mushroom *Pleurotus ostreatus* and its identification based on 16S rDNA analysis[J]. AIP Conference Proceedings, 2018, 2002(1): 020023.
- [32] JIANG WT, CHEN R, ZHAO L, DUAN YN, WANG HY, YAN ZB, SHEN X, CHEN XS, YIN CM, MAO ZQ. Isolation of phloridzin-degrading, IAA-producing bacterium *Ochrobactrum haematophilum* and its effects on the apple replant soil environment[J]. Horticultural Plant Journal, 2023, 9(2): 199-208.
- [33] RASUL M, YASMIN S, YAHYA M, BREITKREUZ C, TARKKA M, REITZ T. The wheat growth-promoting traits of *Ochrobactrum* and *Pantoea* species, responsible for solubilization of different P sources, are ensured by genes encoding enzymes of multiple P-releasing pathways[J]. Microbiological Research, 2021, 246: 126703.