

龙牙百合腐败菌的分离鉴定、生物学特性及抑制剂筛选

Isolation, identification, biological characteristics of spoilage strains in *Lilium brownii* and screening of the relative inhibitors

尹乐斌^{1,2} 李立才¹ 孟庆霞¹ 周娟¹

YIN Le-bin^{1,2} LI Li-cai¹ MENG Qing-xia¹ ZHOU Juan¹

邓鹏¹ 赵良忠^{1,2}

DENG Peng¹ ZHAO Liang-zhong^{1,2}

(1. 邵阳学院食品与化学工程学院, 湖南 邵阳 422000;

2. 豆制品加工技术湖南省应用基础研究基地, 湖南 邵阳 422000)

(1. College of Food and Chemical Engineering, Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422000, China;

2. Soybean Processing Techniques of the Application and Basic Research in Hunan Province, Shaoyang, Hunan 422000, China)

摘要:利用常规组织分离法对湖南隆回地区龙牙百合鳞茎优势腐败菌进行分离纯化,并应用科赫法则验证了分离菌株的致病性,运用形态学和分子生物学技术对腐败菌进行鉴定,同时,探究了9种食品级防腐剂对优势腐败菌的抑制效果。结果表明:引起隆回百合鳞茎腐烂的优势菌是尖孢镰刀菌,该菌菌丝生长和产孢的最适温度分别为30,25℃,菌丝致死温度为66℃处理10 min;菌丝在pH 7,8时生长最快,在pH为7时产孢量最大;可利用多种碳氮源,其中,在以葡萄糖和D-果糖为碳源,牛肉膏为氮源的培养基上生长最快;在以D-木糖为碳源、牛肉膏和L-苯丙氨酸为氮源的条件更有利于产孢;光照有利于菌丝生长和产孢。采用9种食品级防腐剂对该优势菌的抑菌试验结果表明,纳他霉素、脱氢乙酸钠和焦亚硫酸钠对该菌具有显著抑菌效果($P < 0.05$),最低抑菌浓度(MIC)分别为150,125,100 mg/L。

关键词:龙牙百合;尖孢镰刀菌;生物学特性;抑菌效果

Abstract: The pathogenicity of isolated strains of *Lilium brownii* var. *Viridulum* Baker was studied by using conventional tissue

separation method. The pathogenicity of the isolated strains was verified by Koch's law. The morphological and molecular biology techniques were used to identify the spoilage bacteria. Moreover, the inhibitory effects of nine food-grade preservatives on dominant spoilage bacteria were explored. The results showed that the dominant bacteria causing the decay of lily bulbs was *Fusarium oxysporum*. The optimal temperature for growth and sporulation of the mycelium was 30 and 25℃, respectively. The lethal temperature of hyphae was 66℃ for 10 min. The growth rate was the fastest at pH 7 and 8, and the sporulation was the highest at pH 7. A variety of carbon and nitrogen sources could be used, which were grown on a medium with glucose and D-fructose as the carbon source and beef extract as the nitrogen source. In the case of D-xylose as a carbon source, with beef extract and L-phenylalanine as a nitrogen source, it was more conducive to sporulation; light was conducive to mycelial growth and sporulation. The antibacterial test results of 9 kinds of food-grade preservatives against the dominant bacteria showed that natamycin, sodium dehydroacetate and sodium metabisulfite had a significant antibacterial effect against the bacteria ($P < 0.05$), and the minimum inhibitory concentration (MIC) were 150, 125, 100 mg/L, respectively.

Keywords: *Lilium brownii* var. *Viridulum* Baker; *Fusarium oxysporum*; biological characteristics; antibacterial effect

基金项目:湖南省教育厅优秀青年项目(编号:18B427);湖南省科技厅项目(编号:2016RS3035);邵阳学院“双一流”建设产学研合作平台(编号:邵院通[2018]50号);湖南省研究生科研创新项目(编号:CX2018SY035)

作者简介:尹乐斌(1982—),男,邵阳学院副教授,博士。

E-mail: lbyin0731@qq.com

收稿日期:2019-02-03

百合是百合科百合属的多年生鳞茎类草本植物,又

名野百合、白花百合等,龙牙百合为百合属野百合的变种^[1]。百合是中国传统的药食同源植物,富含蛋白质、碳水化合物、膳食纤维、V_{B1}、V_{B2}、尼克酸等营养物质,及钾、铁、锌、硒、铜、锰等微量元素,还含有秋水仙碱、总皂苷、黄酮等活性成分^[2]。常食用百合还可降血糖、抗氧化、抗疲劳、抗癌、增强机体免疫力等保健作用^[3]。

百合鳞茎贮藏期间易发生腐败变质现象,严重影响了百合的实际生产,成为制约百合发展的重要因素之一。已有学者对百合病原菌分离、鉴定及防治措施做了一定研究,Sara 等^[4]研究发现尖孢镰刀菌、层生镰刀菌等菌是引起以色列地区百合鳞茎腐烂的主要腐败菌;王艳等^[5]对吉林、甘肃等 6 省的百合鳞茎样品进行病原菌分离鉴定,研究发现青霉菌、镰刀菌、木霉、黑根霉、毛霉属是其中的优势腐败菌;也有众多学者^[6-7]对不同地区百合腐败菌进行分离鉴定,得到不同的优势腐败菌。可见,地区不同百合腐败的优势菌也不尽相同。目前,鲜有学者^[8]对湖南隆回地区的龙牙百合腐败菌进行研究。本试验拟对该地区龙牙百合腐败菌进行分离鉴定和生物学特性研究,并探究常用的 9 种食品级防腐剂对优势腐败菌的抑制效果,旨在为湖南隆回地区的龙牙百合的防腐贮藏提供理论及实践支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 供试材料

供试龙牙百合鳞茎:采自湖南省邵阳市隆回县,收集后用自封袋密封带回实验室,4℃冰箱保留备用。

1.1.2 供试培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):去皮土豆 200 g,蔗糖 20 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1 000 mL,121℃灭菌 20 min。

查氏培养基:硝酸钠 3 g,磷酸氢二钾 1 g,硫酸镁(MgSO₄·7H₂O)0.5 g,氯化钾 0.5 g,硫酸亚铁 0.01 g,蔗糖 30 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,121℃灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂

DNA 抽提试剂盒:生工生物工程(上海)股份有限公司;

丙酸钙、茶多酚、山梨酸钾:分析纯,郑州康源化工产品有限公司;

丙酸钠、EDTA-2Na:分析纯,南通奥凯生物技术开发有限公司;

壳聚糖、纳他霉素:分析纯,洛阳奇泓生物科技有限公司;

焦亚硫酸钠:分析纯,嘉兴久旭化工有限公司;

脱氢乙酸钠:分析纯,安心生物制品有限公司;

其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

全自动灭菌锅:GI54DWS 型,长沙艾迪生物科技有限公司;

超净工作台:SWP-2 型,广州市康恒仪器有限公司;

电热恒温培养箱:DHP-500 型,常州市万合仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 龙牙百合腐败菌的分离及纯化 分离过程参照阮慧玲等^[9]的方法并稍作修改,以明显腐败的百合组织为分离菌株材料,用接种环挑取形态各异的菌落进行纯培养,将单个纯化菌株进行 PDA 斜面试管接种,4℃冰箱保存。

1.3.2 科赫法则证病 参考文献^[10]并稍作修改,用灭菌解剖针在健康鳞茎上刺孔,将直径 4 mm 菌饼贴于孔上,以刺孔但不贴菌饼的鳞茎为对照,28℃恒温培养,观察发病情况,再从病变鳞茎中分离纯化菌株判定是否为百合腐败菌。

1.3.3 龙牙百合腐败菌的形态特征观察、鉴定 挑取少许分离纯化的菌丝置于 PDA 培养基上 28℃恒温培养,在显微镜下观察菌丝和孢子形态,并测量孢子大小,参考《真菌鉴定手册》^[11]记录的菌落特征描述进行形态学分类鉴定。

1.3.4 龙牙百合腐败菌的现代分子生物学鉴定 菌株 DNA 的提取采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒,引物设计参考尹乐斌等^[12]的方法进行,聚合酶链反应(PCR)体系和反应程序参考 White 等^[13]的方法进行。PCR 产物回收、纯化后送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序后,进行 BLAST 对比分析。

1.3.5 龙牙百合腐败菌的生物学特性研究

(1) 温度对龙牙百合腐败菌菌丝生长和产孢量的影响:设置 10,15,20,25,30,35,40,45℃共 8 个不同温度处理,用点植法接种,每个处理重复 3 次,5 d 后用十字交叉法测量菌落直径,7 d 后用血球计数板测定产孢量^[14]。

(2) pH 对龙牙百合腐败菌菌丝和产孢量的影响:用盐酸-氢氧化钠溶液配制 pH 值分别为 5,6,7,8,9,10,11 的 PDA 培养基,测定方法与 1.3.5(1)一致。

(3) 碳、氮源对龙牙百合腐败菌菌丝和产孢量的影响:以等量碳源的淀粉、葡萄糖、D-木糖、D-果糖、乳糖、甘露醇代替查氏培养基中的蔗糖,配成不同碳源培养基,未添加碳源的培养基作为对照(CK₁);同法以含等量氮源的 L-天冬酸、L-苯丙氨酸、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、硝酸钾配置不同氮源的培养基,以无氮源培养基为对照(CK₂),测定方式与 1.3.5(1)一致。

(4) 光照对龙牙百合腐败菌菌丝和产孢量的影响:将接种后的 PDA 平板分别置于持续光照、持续黑暗和 12 h 光暗交替 3 种培养条件下,测定方法与 1.3.5(1)一致。

(5) 腐败菌菌丝致死温度的测定:设置 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69 °C 共 7 个温度处理, 每个处理用 3 个灭菌试管, 在无菌条件下向每个试管中加入 5 个直径 4 mm 菌饼, 塞好棉塞后在预设的恒温水浴锅中进行加热, 10 min 后取出, 待冷却后随机从每个试管里取出 3 个菌饼放到 PDA 平板上, 置于 28 °C 恒温培养箱中培养, 根据菌饼是否长出菌丝判断致死温度。

1.3.6 抑制剂对龙牙百合腐败菌的抑制效果 参考方中达^[15]的方法修改如下:灭菌去离子水, 按培养基终浓度制备浓度为 3 g/L 的抑制剂母液, 分别加入 2 mL 至无菌培养皿中, 倒入冷却至 50 °C 左右培养基 18 mL, 充分混匀冷却后, 即制成抑制剂最终浓度为 300 mg/L 培养基平板, 同时做 3 个重复试验。接种后在 28 °C 恒温培养箱中培养 2 d, 按式(1)测量各菌的菌落直径计算抑制率^[16]。

$$c = \frac{d_1}{d_1 - d_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——抑制率, %;

d_1 ——对照组菌落直径, mm;

d_2 ——药剂组菌落直径, mm。

初筛出对该菌具有显著抑菌效果的抑制剂, 参照程桂林等^[17]的试管倍比稀释法, 稍作修改:测定抑制剂的 MIC 浓度。每支试管加入 4 mL 灭菌 PDA 液体, 加入 4 mL 受试药物依次倍比稀释, 每种药物稀释 6 个梯度, 第 7 管添加等量无菌水替代菌液, 作为阳性对照, 第 8 管未添加抑制剂, 作为阴性对照。将试验菌液用灭菌生理盐水稀释成 10^{-6} 个/mL 浓度, 取 100 μ L 分别加入至上述各试管中, 混匀后于 28 °C 温箱中培育 24 h 后观察结果。肉眼观察到澄清透明的试管, 其中的抑制剂浓度即为菌株的 MIC。

1.4 数据处理

采用 SPSS 17.0 进行数据分析, Origin 进行绘图, 试验结果以(平均值 $\pm$ 标准差)表示。

2 结果与分析

2.1 龙牙百合腐败菌的分离及纯化

在 PDA 平板上通过平板划线可以分离、纯化出不同形态的真菌, 以肉眼可见的占生长优势的霉菌作为分离纯化对象, 得到的优势菌记作菌 W-1(图 1)。

2.2 科赫法则证明

接种 W-1 菌株的百合鳞茎均出现明显的腐败现象(图 2)。再从腐败百合进行病原分离, 获得与原真菌一样的菌株。根据科赫氏法则, 证实菌 W-1 为百合腐败菌。

2.3 龙牙百合腐败菌的形态特征观察、鉴定

W-1 在 PDA 平板培养基上培养, 菌落呈突起絮状, 菌丝颜色呈白色, 基物颜色从第 2 天到第 7 天都在不断



图 1 霉菌在龙牙百合上生长
Figure 1 Mold grows on *Lilium brownii* var. *Viridulum* Baker



图 2 健康龙牙百合接种菌 W-1 后的情况
Figure 2 After the inoculating bacteria W-1 of healthy *Lilium brownii* var. *Viridulum* Baker

变化, 主要是从白色变为莖色、桃红色, 再变为深紫色, 如图 3(a)、(b); 孢子存在 2 种分生孢子形态, 小孢子数目较多, 呈长椭圆形、卵形, 单细胞, 大小 $(8 \sim 12) \mu\text{m} \times (2 \sim 3) \mu\text{m}$; 大孢子数目较少, 呈长椭圆形弯曲, 镰刀状, 两头稍尖, 如图 3(c)、(d), 初步判定为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。

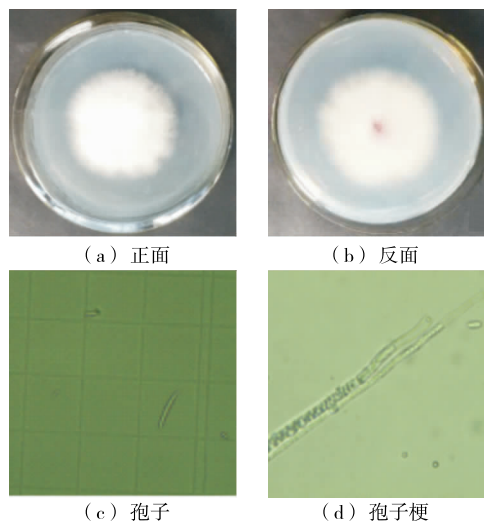


图 3 W-1 菌株形态观察
Figure 3 Morphological observation of W-1 strain

2.4 龙牙百合腐败菌的现代分子生物学鉴定

测得的 rDNA-ITS 序列长度为 536 bp, 经过 GenBank 同源性分析选取相似性最高的 7 个菌株, 结果如表 1 所示。

表 1 菌株 ITS 序列同 GenBank 中霉菌菌株同源性比较

Table 1 Comparison of homology between strain ITS sequences and mold strains in GenBank

菌株名	菌株名	登录号	分值	相似性/%
<i>Fusarium oxysporum</i>	MFG/0	MH911386.1	990	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	MF11	MH911375.1	990	100
<i>Fusarium verticillioides</i>	MRCF17	MH880113.1	990	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	TH9Bg0	MH725595.1	990	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	NEAU-LCX1	MH469710.1	990	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	F403	MG515306.1	990	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	H3	HM210092.1	990	100

从表 1 可以看出,通过 ITS 序列同源性比较,该菌株与 GenBank 中 7 株尖孢镰刀菌的 ITS 序列相似性均达到 100%,而且分值最高的全部为尖孢镰刀菌。根据同源性比较结果,可以初步确认 W-1 菌为尖孢镰刀菌。根据 ITS 序列同源性,从 GenBank 中选择 10 个菌株的 ITS 基因序列,应用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。由图 4 可知, W-1 菌与尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* (MH911386.1) 在一个分支中,且 W-1 和尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* (MH911386.1) 的亲缘关系最近,故由形态和分子鉴定结果将该菌鉴定为镰刀菌属尖孢镰刀菌,命名为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) W-1。

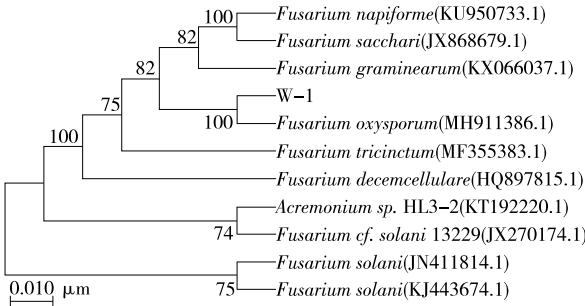


图 4 以 ITS 序列为基础构建的 W-1 菌株的系统发育树
Figure 4 Phylogenetic tree of W-1 strain constructed based on ITS sequence

2.5 尖孢镰刀菌 W-1 的生物学特性研究

2.5.1 温度对菌株 W-1 菌丝生长和产孢量的影响 由图 5 可知,菌株 W-1 具有较强的生存能力,在 10~40℃ 范围内均可生长、产孢,温度达到 45℃ 时菌丝不生长,在 30℃ 时菌丝生长最快,5 d 后菌落直径达 62.95 mm,在 25℃ 时产孢量最大,7 d 后产孢量为 4.63×10^6 个/mL,且显著($P < 0.05$)高于其他处理组,与曾富春等^[18]和潘虹等^[19]的研究结果一致。

2.5.2 pH 对菌株 W-1 菌丝和产孢量的影响 由图 6 可知,在 pH 5~11 范围内,菌株 W-1 均能生长、产孢,随着 pH 的升高,菌株直径呈先增加后减小趋势,在 pH 7、8 时

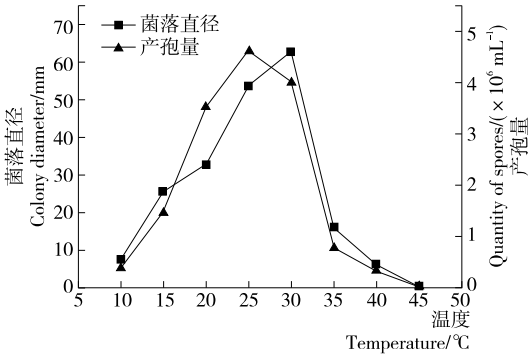


图 5 温度对菌株 W-1 菌丝生长和产孢量的影响
Figure 5 Effect of temperature on mycelial growth and sporulation of strain W-1 ($n = 3$)

菌丝生长最快,生长 5 d 后菌落直径达 56.68, 57.28 mm, 与耿丽华等^[20]的研究结果一致,且随着 pH 的继续增大,菌落直径相应递减,但幅度比酸性条件下小,可见,该菌更适宜在中性偏碱性的环境中生长;pH 为 7 时,产孢量最大为 4.81×10^6 个/mL,不同 pH 对该菌产孢影响差异显著,说明通过将土壤调至弱酸性可对百合腐败菌起到一定的抑制作用。

2.5.3 碳、氮源对菌株 W-1 菌丝和产孢量的影响 由表 2 可以看出,菌株 W-1 菌丝在单糖、多糖、糖醇为碳源

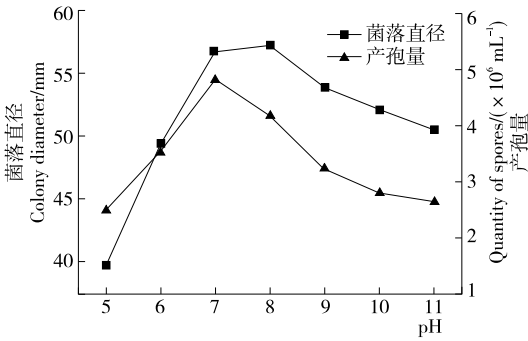


图 6 pH 对菌株 W-1 菌丝和产孢量的影响
Figure 6 Effect of pH on mycelium and sporulation of strain W-1 ($n = 3$)

表 2 碳源对菌株 W-1 菌丝生长和产孢量的影响[†]

Table 2 Effect of different carbon sources on mycelial growth and sporulation of strain W-1 (*n* = 3)

碳源	菌落直径/mm	产孢量/($\times 10^6$ mL ⁻¹)
葡萄糖	56.97 $\pm$ 1.32 ^a	3.38 $\pm$ 0.03 ^b
淀粉	54.22 $\pm$ 1.46 ^b	3.43 $\pm$ 0.06 ^b
D-木糖	53.85 $\pm$ 1.35 ^b	4.06 $\pm$ 0.08 ^a
乳糖	53.80 $\pm$ 1.12 ^b	1.23 $\pm$ 0.06 ^d
D-果糖	55.20 $\pm$ 1.20 ^{ab}	3.33 $\pm$ 0.10 ^b
甘露醇	41.79 $\pm$ 0.49 ^d	2.33 $\pm$ 0.06 ^c
对照 CK ₁	46.76 $\pm$ 0.59 ^c	1.21 $\pm$ 0.08 ^d

[†] 字母不同表示差异显著(*P* < 0.05)。

的培养基中均可生长,说明该菌碳源利用谱较广。在以葡萄糖和 D-果糖为碳源的培养基上生长较快,且在统计学 0.05 水平上无显著差异性,与巩慧玲等^[9]研究结果类似;在以甘露醇为碳源的培养基上生长最慢,甚至比对照组生长更慢,说明甘露醇对于该菌来说并不适合作为碳源使用,与赵杰^[21]对于尖孢镰刀菌的研究结果有一定差异,可能与菌株和基础培养基不同有关。该菌在以 D-木糖为碳源时,产孢量最大,以葡萄糖、淀粉和 D-果糖为碳源时,三者产孢量无显著差异,不添加碳源的对照组产孢量最少,说明适合的碳源有助于菌丝生长和产孢。

由表 3 可知,菌株 W-1 对不同氮源的利用情况差异显著,在以牛肉膏为氮源的培养基上生长最快,生长 5 d 后菌落直径达到 65.13 mm,其次,以蛋白胨和硝酸钾为氮源的培养基生长速度较快,且两者无显著差异,在 L-天冬酸为氮源的培养基上生长最慢,甚至比对照组还慢,说明 L-天冬酸不适合作为菌株 W-1 的氮源;该菌在以牛肉膏和 L-苯丙氨酸为氮源的培养基上产孢量最大,7 d 后产孢量分别为 3.48×10^6 , 3.49×10^6 个/mL,在不添加氮源的培养基上产孢量最少,仅 2.13×10^6 个/mL。综上,牛肉膏更适合该菌株生长,可能是牛肉膏含有多肽类、氨基酸

表 3 氮源对菌株 W-1 菌丝生长和产孢量的影响[†]

Table 3 Effect of different nitrogen sources on mycelial growth and sporulation of strain W-1 (*n* = 3)

氮源	菌落直径/mm	产孢量/($\times 10^6$ mL ⁻¹)
L-天冬酸	31.12 $\pm$ 1.10 ^d	2.13 $\pm$ 0.08 ^d
L-苯丙氨酸	51.88 $\pm$ 0.75 ^c	3.49 $\pm$ 0.03 ^a
蛋白胨	57.67 $\pm$ 0.67 ^b	2.33 $\pm$ 0.06 ^b
牛肉膏	65.13 $\pm$ 1.41 ^a	3.48 $\pm$ 0.03 ^a
酵母膏	51.75 $\pm$ 0.51 ^c	2.31 $\pm$ 0.12 ^{bc}
硝酸钾	56.07 $\pm$ 1.29 ^b	2.20 $\pm$ 0.08 ^{cd}
对照 CK ₂	44.78 $\pm$ 1.23 ^d	2.13 $\pm$ 0.06 ^c

[†] 字母不同表示差异显著(*P* < 0.05)。

类、核苷酸类、矿物质类及维生素类的水溶性物质,营养成分丰富,可以满足菌株 W-1 菌丝的生长需求,而酵母膏、无机氮源等氮源相对成分单一,提供的营养效果无牛肉膏显著。

2.5.4 光照对菌株 W-1 菌丝和产孢量的影响 由表 4 可知,不同光照处理条件下,各组菌丝生长情况不同:在连续光照条件下,菌丝直径和产孢量都达到最大,分别为 58.09 mm 和 3.18×10^6 个/mL,与其他处理组相比具有显著差异性(*P* < 0.05),说明光照有利于该菌生长。

表 4 光照对菌株 W-1 菌丝和产孢量的影响[†]

Table 4 Effect of different light on the mycelium and sporulation of strain W-1 (*n* = 3)

光照条件	菌落直径/mm	产孢量/($\times 10^6$ mL ⁻¹)
连续光照	58.09 $\pm$ 0.45 ^a	3.18 $\pm$ 0.09 ^a
连续黑暗	47.08 $\pm$ 0.12 ^c	2.23 $\pm$ 0.08 ^c
光暗交替	49.44 $\pm$ 0.54 ^b	2.64 $\pm$ 0.06 ^b

[†] 字母不同表示差异显著(*P* < 0.05)。

2.5.5 菌株 W-1 菌丝致死温度的测定 菌株 W-1 菌丝在 51, 54, 57, 60, 63 ℃ 处理 10 min 还能生长,但在 66, 69 ℃ 处理 10 min 后不能生长,说明该腐败菌菌丝的致死温度为 66 ℃, 10 min。

2.6 抑制剂对龙牙百合腐败菌的抑制效果

抑制剂浓度为 300 mg/L 时,由表 5 可知,纳他霉素对菌株 W-1 的抑菌效果最好,抑制率为 95.98%,脱氢乙酸钠和焦亚硫酸钠对菌株 W-1 的抑菌效果次之,抑制率分别为 86.97%, 86.67%;茶多酚和丙酸钠与对照组无显著差异,表明这 2 种抑制剂对菌株 W-1 无抑菌效果;其他抑菌剂都有一定抑菌效果,但抑菌效果有限。

采用试管倍比稀释法测定 3 种抑制剂的 MIC 浓度,

表 5 防霉剂对菌株 W-1 的抑制效果[†]

Table 5 Inhibition effect of different antifungal agents on strain W-1 (*n* = 3)

防霉剂	菌落直径/mm	抑制率/%
对照	26.25 $\pm$ 0.07 ^a	/
EDTA-2Na	23.33 $\pm$ 0.07 ^b	11.12
壳聚糖	20.25 $\pm$ 0.02 ^c	22.86
山梨酸钾	17.08 $\pm$ 0.10 ^d	34.93
脱氢乙酸钠	3.42 $\pm$ 0.16 ^e	86.97
茶多酚	25.42 $\pm$ 0.15 ^a	3.16
丙酸钠	25.50 $\pm$ 0.04 ^a	2.86
丙酸钙	22.83 $\pm$ 0.08 ^b	13.03
焦亚硫酸钠	3.50 $\pm$ 0.02 ^e	86.67
纳他霉素	0.67 $\pm$ 0.06 ^f	95.98

[†] 字母不同表示差异显著(*P* < 0.05)。

结果表明,脱氢乙酸钠 MIC 浓度为 150 mg/L,与李忠平等^[22]报道结果相似,纳他霉素、焦亚硫酸钠 MIC 浓度分别为 125,100 mg/L,目前尚无关于那他霉素和焦亚硫酸钠对于尖孢镰刀菌的抑菌报道,隋莎莎等^[23]、李永才等^[24]关于那他霉素和焦亚硫酸钠对青霉菌的抑制效果研究,结果与本试验有差异,可能是试验方法和试验菌株差异或试验误差所致。

3 结论

通过分离纯化生长在龙牙百合上的优势腐败菌,确定了引起湖南隆回地区的龙牙百合鳞茎腐烂的病原菌为尖孢镰刀菌,该菌菌丝在 30 ℃、pH 7.8 条件下生长最快,菌丝致死温度 66 ℃ 处理 10 min;该菌可利用多种碳氮源,其中,在以葡萄糖和淀粉为碳源,牛肉膏为氮源的培养基上生长最快;在 25 ℃、pH 7 的情况下产孢量最大,以 D-木糖为碳源、牛肉膏和 L-苯丙氨酸为氮源的条件更有利于产孢;光照有利于该菌菌丝生长和产孢。9 种食品级防腐剂对该菌的抑菌效果表明,纳他霉素、脱氢乙酸钠和焦亚硫酸钠对该菌具有显著抑菌效果,MIC 浓度分别为 150,125,100 mg/L。使用食品级抑菌剂对龙牙百合进行抑菌,为生产实践中的百合防腐贮藏提供有价值的指导。本研究后续工作可分 2 个方向进行,对初筛抑菌剂试验得到的 3 种高效抑菌剂进行复配,提升抑菌效果,减少抑菌剂的用量;针对分离出的腐败菌的生物学特性进行病害的防控工作,如通过调节贮藏期的温度、pH 等因子来抑制病原菌生长的效果,最终达到高效的百合病害防控效果。

参考文献

[1] 罗仕凤. 川黔地区百合属植物资源表型多样性及孢粉学研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011: 1-2.

[2] 胡才. 百合: 抗癌润肺[J]. 养生月刊, 2015(1): 42-43.

[3] 赵秀玲. 百合的营养成分与保健作用[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(1): 44-46.

[4] SARA L M, ERLICH O, MAYMON M, et al. Bulb and root rot in lily (*Lilium longiflorum*) and onion (*Allium cepa*) in Israel[J]. Journal of Phytopathology, 2014, 162(7/8): 466-471.

[5] 王艳, 杜彼, 连中学, 等. 百合鳞茎带真菌检测[J]. 甘肃中医学院学报, 2011, 28(2): 48-51.

[6] LAWSON R H, HSU H T. Lily diseases and their control[J]. Acta Horticulturae, 1996(414): 175-188.

[7] PRADOS-LIGERO A M, BASALLOTE-UREBA M J, MELERO-VARA J M. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. lili and *F. proliferatum* affecting *Lilium* crops in Spain[J]. Trop Plant Pathology, 2008, 33(3): 235-236.

[8] 朱海燕, 夏花, 高必达. 湖南省食用百合生长期鳞茎腐烂病的病原鉴定[J]. 植物病理学报, 2012, 42(5): 525-527.

[9] 巩慧玲, 孙爱洁, 李茜, 等. 兰州百合鳞茎贮藏腐烂病原菌的鉴定及生物学特性[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 97-101.

[10] 梁巧兰, 徐秉良, 刘艳梅. 观赏百合根腐病原菌鉴定及药剂筛选[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 39(1): 25-28.

[11] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 1-780.

[12] 尹乐斌, 雷志明, 孔彦卓, 等. 一株高产果胶酶的真菌分离鉴定及酶学特性[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 93-97.

[13] WHITE T J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[J]. PCR Protocols, 1994(38): 315-322.

[14] 丁文姣, 于安芬, 李瑞琴, 等. 定西市黄芪根腐病优势病原菌生物学特性研究[J]. 甘肃农业科技, 2018(3): 33-36.

[15] 方中达. 植物研究法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 124.

[16] 王凡, 胡奎, 陈然, 等. 8 种杀菌剂对核桃根腐病菌室内毒力测定[J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2013, 10(23): 4-6.

[17] 程桂林, 徐淑芳, 刘风华. 大蒜挥发油对猪肉四种常见致病菌的抗菌效果[J]. 动物营养学报, 2009, 21(4): 554-560.

[18] 曾富春, 黄云, 赵艳琴, 等. 草莓枯萎病菌的生物学特性[J]. 四川农业大学学报, 2006, 24(2): 156-160.

[19] 潘虹, 关凤芝, 吴广文, 等. 尖孢镰刀菌亚麻专化型生物学特性研究[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(7): 50-56.

[20] 耿丽华, 李常保, 迟胜起, 等. 番茄颈腐根腐病原菌鉴定及不同条件对其生长的影响[J]. 植物病理学报, 2012, 42(5): 449-455.

[21] 赵杰. 山东省烟草镰刀菌根腐病病原及生物学特性的研究[D]. 青岛: 中国农业科学院, 2013: 19-23.

[22] 李忠平, 周岩民, 陈敏, 等. 脱氢醋酸钠防霉效果的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2008(7): 32-34.

[23] 隋莎莎, 李志文, 张平, 等. 纳他霉素结合柠檬酸处理对葡萄采收后灰霉菌的抑制活性[J]. 食品科学, 2013, 34(24): 299-303.

[24] 李永才, 毕阳. 钼酸铵和焦亚硫酸钠对采后苹果青霉病和黑斑病的控制[J]. 食品科技, 2008, 33(12): 238-241.