

紫薯腐败菌的分离与鉴定

刘 绪^{1,2}, 郑 运¹, 黄潇漪¹, 陈 婷¹, 尹淑涛³, 杜亚飞^{1,2},
王海英¹, 张 珊¹, 张华玲^{1,2*}

(1. 成都师范学院化学与生命科学学院, 成都 611100; 2. 特色园艺生物资源开发与利用四川省高校重点实验室, 成都 611100; 3. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 目的 从自然腐败的紫薯上分离纯化紫薯腐败菌, 通过反接种确定其腐蚀性, 并将其鉴定到属。
方法 通过多次稀释涂布平板法进行单菌落形态学观察, 将菌株反接种到新鲜紫薯上, 筛选出腐败菌, 以真菌 ITS 序列、细菌 16S rDNA 序列构建发育树, 鉴定到属, 再将鉴定结果与分离的菌株的形态学鉴定结果对比, 验证菌株鉴定结果。**结果** 从样品中分离出 6 种典型腐败菌, 有 4 种属, 分别为枝孢霉属、青霉属、曲霉属、芽孢杆菌属。**结论** 确定紫薯的腐败菌为哥氏枝孢霉(*Cladosporium gossypicola*)、基督青霉(*Penicillium christenseniae*)、热带青霉(*Penicillium tropicum*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) 和阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhattai*)。

关键词: 紫薯; 分离; 鉴定; 腐败菌

Isolation and identification of spoilage bacteria from *Solanum tuberosum*

LIU Xu^{1,2}, ZHENG Yun¹, HUANG Xiao-Yi¹, CHEN Ting¹, YIN Shu-Tao³, DU Ya-Fei^{1,2},
WANG Hai-Ying¹, ZHANG Shan¹, ZHANG Hua-Ling^{1,2*}

(1. Chemistry and Life Science College, Chengdu Normal University, Chengdu 611100, China; 2. Sichuan Provincial Key Laboratory for Development and Utilization of Characteristic Horticultural Biological Resources, Chengdu 611100, China; 3. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: Objective To isolate and purify the spoilage bacteria from natural spoilage *Solanum tuberosum*, then determine its spoilage by anti-inoculation, and then identify the genus. **Methods** The morphology of single colony was observed by multiple dilution coating plate method. Then the strains were inoculated on fresh *Solanum tuberosum*, and the spoilage bacteria were screened out. The phylogenetic tree was constructed with fungal sequence and bacterial 16S rDNA sequence, and the genus was identified. The identification results were compared with the morphological identification results of isolated strains to verify the identification results. **Results** Six kinds of typical spoilage bacteria were isolated from the samples, including 4 kinds of genera: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Bacillus*. **Conclusion** *Cladosporium gossypicola*, *Penicillium christenseniae*, *Penicillium tropicum*, *Aspergillus flavus*, *Bacillus velezensis* and *Bacillus aryabhattai* are identified as the spoilage bacteria of *Solanum tuberosum*.

KEY WORDS: *Solanum tuberosum*; isolation; identification; spoilage bacteria

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(2022YFN0059)、国家创新创业训练计划项目(S202114389089)

Fund: Supported by the Key Research and Development Projects of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (2022YFN0059), and the National Innovation Entrepreneurship Training Program (S202114389089)

*通信作者: 张华玲, 硕士, 讲师, 主要研究方向为农产品保鲜、基因克隆、微生物酿造等。E-mail: 3985151@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Hua-Ling, Master, Lecturer, Chemistry and Life Science College, Chengdu Normal University, No.99, East of Haike Road, Chengdu 611100, China. E-mail: 3985151@qq.com

0 引言

紫薯(*Solanum tuberosum*), 又称紫心甘薯、黑薯, 为 20 世纪日本培养出的新品种, 属于甘薯类的一种, 其果皮和果肉均呈深紫红色。紫薯具有很高的营养价值^[1-3]和保健功效^[4-6], 紫薯的块根中含有大量的淀粉、膳食纤维、矿物质、花青素、维生素^[7]等, 并且脂肪含量较低。其中花青素较其他植物更稳定, 是天然色素的重要来源, 且富含硒, 有抗癌的功效^[8-9]。

近年, 四川、重庆、云南、贵州等省开始大规模发展紫薯产业, 我国紫薯种植面积已达 277.5 万亩, 总产量在 455.1 万 t 左右^[10]。但紫薯含水量高, 皮薄肉嫩、体积大, 贮藏期易发生失水萎焉、内部组织出现糠心现象, 在收获时, 易出现机械伤, 在较高温度条件下容易被腐败菌侵染, 产生白色、绿色、黄色菌丝及透明黏状物或者绒状菌丝等^[11], 贮藏过程易发生腐败、霉烂, 损失率达 5%~10%, 且紫薯被腐败菌侵染后会严重影响紫薯的出售、口感及食用安全, 造成了巨大经济损失, 限制了产业发展。因此, 亟需有关紫薯腐败菌方面的研究。

目前对于紫薯的研究主要集中在紫薯新品种培育、紫薯发酵酒、紫薯花青素类化妆品、保健食品、紫薯营养全粉等的研究开发方面, 而关于紫薯腐败菌的研究鲜见报道。对于薯类微生物的相关研究, 也只有少数病原菌的鉴定, 如孙江丽等^[12]从软腐的甘薯中分离病原菌, 以菌株形态学观察、回接发病症及分子生物学等方法, 鉴定得出病原菌为米根霉(*Rhizopus oryzae*); 段鹏等^[13]从腐烂甘薯块根中分离得到 4 株丝状真菌分别编号为 SP-1、SP-2、SP-3 和 SP-4, 通过形态学观察和分子生物学方法, 鉴定得出 SP-1 菌株是匍枝霉(*Rhizopus stolonifer*) SP-1、SP-2 是尖镰孢(*Fusarium oxysporum*) SP-2、SP-3 是康宁肉座菌(*Hypocreaoningii*) SP-3、SP-4 是肉座菌属(*Hypocrea*), 命名为 *Hypocrea* sp. SP-4; 高波等^[14]对广东湛江采集的甘薯, 经对病原菌进行分离, 采用科赫氏法则回接验证, 依据病原菌的形态特征和分子生物学方法, 确定该病害为甘薯爪哇黑腐病, 病原菌为可可毛色二孢(*Lasiodiplodia theobromae*)。本研究对紫薯腐败菌进行分离纯化, 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增, 找到亲缘关系相近的菌株, 鉴定到属, 旨在分离与鉴定出导致紫薯腐败的优势腐败菌, 为控制紫薯采收和贮藏时的腐败菌侵染和后续抑制紫薯腐败菌实验提供理论依据, 也为紫薯保鲜技术提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

新鲜健康紫薯: 共计 168 个, 取自四川省农业科学院

生物技术核技术研究所(原种植于金堂县转龙镇)。其中 42 个取回后, 模拟采后袋装擦伤(施加网袋磨损、自然摔、碰伤等, 使其出现伤口), 于自然条件(室温)下贮藏 1 月后腐烂, 无菌条件下取腐败紫薯进行实验; 另 126 个新鲜健康紫薯待进行优势腐败菌致病性验证实验。

无水乙醇(分析纯, 成都金山化学试剂有限公司); 草酸铵结晶紫液、路哥氏碘液(分析纯, 上海展云化工有限公司); 氯化钠、二甲苯(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)(上海博微生物科技有限公司); 牛肉膏蛋白胨培养基(北京鸿润宝顺科技有限公司); Sangon 真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司); 1×TSE101 金牌 mix、高纯度低电渗琼脂糖、DNA 凝胶回收试剂盒、Tsingke 细菌 DNA 提取试剂盒(通用型)、DL5000 Marker(擎科生物成都分公司)。

真菌通用引物 ITS1、ITS4, 细菌通用引物 27F、1492R 的合成及扩增产物的测序由擎科生物成都分公司完成。

1.2 仪器与设备

3730XL 测序仪、2720 thermal cycler PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司); Legend Micro17 离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); JY300C 电泳仪、JYDF(定制)电泳槽、JY04S-3C 凝胶成像仪(北京君意东方电泳设备有限公司); DGL-35B 立式压力蒸汽灭菌器(上海力辰邦西仪器科技有限公司); Excella E24R 低温摇床(德国 Eppendorf 公司); HH-1S 电热恒温水浴锅(上海助蓝仪器科技公司); VD-650 超净工作台(西安尚光仪器有限公司); LRH-70 电热恒温培养箱(上海易恒科学仪器有限公司); SC-196 透明门立式冷藏箱(浙江星星冷链集成股份有限公司); EKUP 超纯水机(四川宜科纯水设备有限公司); ZGJZQ-10 拍击式均质器(上海梓桂仪器有限公司); 301M 双筒显微镜(深圳绿康光学电子科技有限公司); HC2004 千分之一电子天平(上海花潮实业有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理

在无菌条件下切下腐败紫薯 50 g, 碾碎后放入装有 200 mL 无菌生理盐水的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 3 min, 制成 1:5 (g:mL)的样品匀液^[15]。

1.3.2 取菌、纯化分离

将匀液静置(5 min)后, 取 1 mL 上清液, 用无菌生理盐水进行 10 倍梯度稀释。其中稀释梯度选择 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} , 分别涂布于牛肉膏蛋白胨培养基和 PDA 培养基, 每个梯度涂两个平板, 预留一个空白平板作对照。放置于恒温培养箱中培养, 细菌培养条件为 37°C、24 h; 真菌培养条件为 28°C、48 h。

从上述培养基的平板中挑取各种具有不同形态的单

菌落,先在培养基上富集培养,再反复平板划线分离,至少 3 次划线分离后,再用稀释涂布法,肉眼观察是否得到纯化单菌落。由于细菌直径一般为 $0.5\sim 5\ \mu\text{m}$,霉菌直径一般为 $2\sim 10\ \mu\text{m}$,因此,一个平板内的单菌落数不能过多,需仔细观察每个单菌落的形态,再将纯化的单菌落菌株接种于试管斜面培养基,保存于 4°C 冰箱并编号备用。若得到单菌落除了颜色外,其余菌落形态学特征基本一致,则应延长培养时间 $1\sim 2\ \text{d}$,观察是否为同一菌株。

1.3.3 侵染实验

将纯化的单菌落扩大培养,并制成一定浓度($10^5\sim 10^6\ \text{CFU/mL}$)的菌悬液,采用有伤接种方法进行侵染实验。本研究采用切片接种,切片接种是将紫薯对半切开,喷洒适量菌液(约 $5\ \text{mL}$),每组 5 个紫薯,定期($2\ \text{d/次}$)喷洒适量菌液(约 $5\ \text{mL}$),以未接种腐败菌的紫薯喷洒等量生理盐水作对照,3 次重复,且套袋(聚乙烯薄膜袋)处理,细菌于温度 37°C 、真菌于温度 28°C ,相对湿度为 90% 贮藏,每天观察紫薯的腐败情况,验证分离的菌株的致病性,总观察周期为 $8\ \text{d}$ 。

1.3.4 菌种鉴定

(1) 镜检

显微镜观察参考《伯杰细菌手册》^[16]《真菌鉴定手册》^[17]和《常见常用真菌》^[18],对腐败菌进行初步的菌落形态观察,包括菌落的大小、边缘情况、正反面颜色、透明度、隆起状态、是否易挑取、质地等。显微镜下观察菌株是否有芽孢、形状、排列等。

(2) 分子生物学鉴定

将分离纯化的菌株分别使用 Sangon 真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒和 Tsingke 细菌 DNA 提取试剂盒(通用型)进行优势菌 DNA 提取。

以细菌的通用引物 27F ($5'\text{-AGTTTGATCMTGGCTG-3}'$)和 1492R ($5'\text{-GGTTACCTTGTTACGAC-3}'$)对细菌菌株进行 16S rDNA 扩增。

以真菌的通用引物 ITS1 ($5'\text{-TCCGTAGGTGAACC TGCGG-3}'$)和 ITS4 ($5'\text{-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3}'$)对真菌菌株进行 ITS 扩增。

PCR 扩增体系: 总体积 $50\ \mu\text{L}$,包括上游引物 $2\ \mu\text{L}$ 、下游引物 $2\ \mu\text{L}$ 、 $1\times\text{TSE101}$ 金牌 mix $45\ \mu\text{L}$ 、DNA 模板 $1\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: $98\text{°C}/2\ \text{min}$ 预变性, $98\text{°C}/10\ \text{s}$ 变性, $56\text{°C}/10\ \text{s}$ 退火, $72\text{°C}/10\ \text{s}$ 延伸, 35 个循环, $72\text{°C}/5\ \text{min}$ 终延伸。将扩增好的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, $300\ \text{V}$ 电压下 $12\ \text{min}$, 获得凝胶电泳图,由擎科生物成都分公司测序部进行测序,获得的序列用 ContigExpress 拼接测序结果,去除两端不准的部分,将拼接序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 同源性比对,下载多个同源性高的完整序列,以 MEGA 11.0 软件进行菌株序列和下载的完整序列的相似性排列,得出排列结果,将其用 N-J 法构建系统发育树,分析发育树结构,得到近缘菌株。

2 结果与分析

2.1 紫薯腐败细菌的初筛

样品匀液制成后静置($5\ \text{min}$),将上清液加入 PDA 培养基于 28°C 培养 $48\ \text{h}$ 得到真菌总菌群,经过多次分离纯化,得到 6 种形态学不同的真菌,编号为 A、B、C、D、E、F。

样品匀液制成后静置($5\ \text{min}$),将上清液加入牛肉膏蛋白胨培养基于 37°C 培养 $24\ \text{h}$ 得到细菌总菌群,经过多次分离纯化,得到两种形态学不同的细菌,编号为 G、H。

2.2 侵染的反接种验证

采用有伤接种(切片)的方法,将菌株 A、B、C、D、E、F 分别接种于完好的新鲜紫薯后,套袋处理,设置温度为 28°C ,相对湿度为 90% ,置于恒温培养箱中;将菌株 G、H 分别接种于完好的新鲜紫薯后,套袋处理,设置温度为 37°C ,相对湿度为 90% ,置于恒温培养箱中,并同时放置添加了生理盐水的新鲜紫薯用于对照,分别观察其致病性。实验结果如图 1 所示,其中 A、C、E、F、G、H 菌株侵染的紫薯具有强烈的腐败气味,表面出现菌体生长,并且出现软烂、发黑状况,B、D 菌株侵染的紫薯没有发生明显腐败现象,而对照组紫薯颜色、气味正常,只有表面轻微变干、有点发白。因此验证出 A、C、E、F、G、H 菌株均为紫薯优势腐败菌。

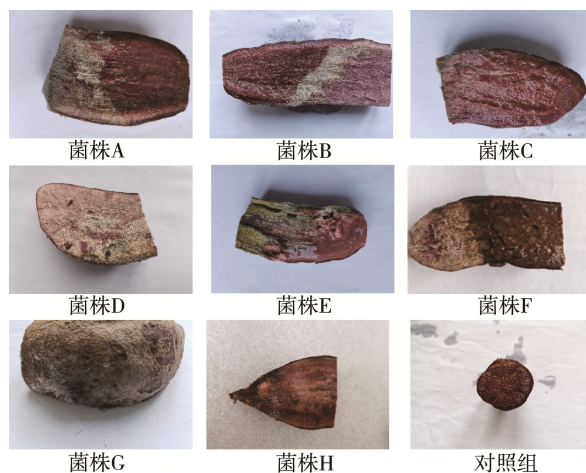


图 1 反接种腐败紫薯与对照组紫薯对比
Fig.1 Comparison of anti-inoculation spoiled *Solanum tuberosum* and control group

2.3 紫薯优势腐败菌形态学观察

分离所得 6 株优势腐败菌的菌落形态学基本特征和单菌落图,分别见表 1、图 2 所示,参照《真菌鉴定手册》《常见常用真菌》和《伯杰细菌手册》,初步判断菌株 A、C、E、F、G、H 分别为枝孢霉属、青霉属、曲霉属、青霉属、芽孢杆菌属、芽孢杆菌属。

表 1 优势腐败菌形态学基本特征

Table 1 Morphological characteristics of dominant spoilage bacteria

菌株编号	菌落形态特征
A	呈圆形, 边缘整齐, 颜色正面为深褐绿色, 反面为黑色, 呈绒状
C	呈圆形, 边缘整齐, 颜色正面为青绿色, 反面为黄色, 斑点状
E	呈圆形, 边缘整齐, 颜色正反面一致为草绿色, 粉末状
F	呈圆形, 边缘整齐, 颜色正面为灰绿色, 反面为红褐色, 边缘带白色绒毛
G	呈圆形, 边缘整齐, 颜色正反面一致为奶油色, 不透明, 扁平, 不易挑取, 粗糙、表皮起皱, 显微镜下可观察到菌株是带有芽孢的杆菌
H	呈圆形, 边缘整齐, 颜色正反面一致为乳黄色, 透明度较差, 凸起, 易挑取, 湿润, 显微镜下可观察到菌株是带有芽孢的杆菌

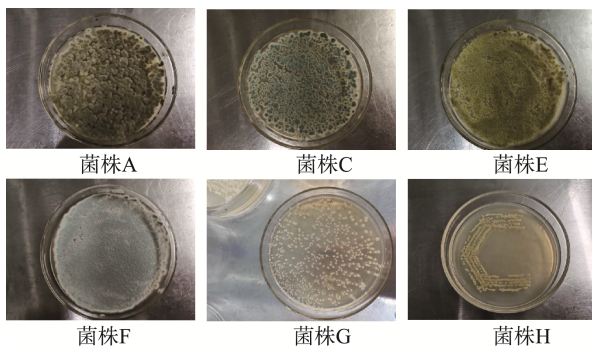


图 2 优势腐败菌单菌落图

Fig.2 Single colony diagrams of dominant spoilage bacteria

2.4 PCR 扩增结果

通过 Sangon 真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒和 Tsingke 细菌 DNA 提取试剂盒(通用型)将真菌和细菌 DNA 提取出后, 再取一定量稀释, 作为 PCR 扩增模板, 以擎科 1×TSE101 金牌 mix 进行扩增, 将扩增好的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 300 V 电压下 12 min, 获取图 3 凝胶电泳图, 细菌菌株 G、H 在 1500 bp 附近出现较强的条带, 说明 2 株细菌的 16S rDNA 均被成功扩增; 真菌菌株 F、E、C、A 在 750 bp 附近出现较明显的条带, 说明 4 株真菌的 ITS 序列均被成功扩增。

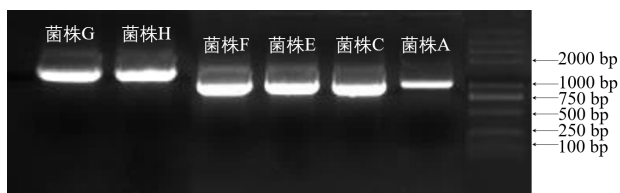


图 3 优势腐败菌 PCR 鉴定电泳结果图

Fig.3 PCR identification and electrophoresis of dominant spoilage bacteria

2.5 Blast 序列比对

将擎科生物成都分公司测得的基因序列, 用 ContigExpress 拼接测序结果, 并去除两端不准的部分, 将拼接序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 同源性比对, 得出与菌株 A 序列相似度最高的菌株皆为枝孢霉属, 与菌株 C 序列相似度最高的菌株皆为青霉属, 与菌株 E 序列相似度最高的菌株皆为曲霉属, 与菌株 F 序列相似度最高的菌株皆为青霉属, 与菌株 G 序列相似度最高的菌株皆为芽孢杆菌属, 与菌株 H 序列相似度最高的菌株皆为芽孢杆菌属, 且相似度皆达 99% 以上。

2.6 系统发育树的构建

用 MEGA 11.0 软件构建出系统发育树, 发育树见图 4~5。从图 4 的发育树中可看出菌株 A 的近缘菌株是哥氏枝孢霉(*Cladosporium gossypicola*); 菌株 C 的近缘菌株是基督青霉(*Penicillium christenseniae*); 菌株 E 的近缘菌株是黄曲霉(*Aspergillus flavus*); 菌株 F 的近缘菌株是热带青霉(*Penicillium tropicum*), 从图 5 的发育树中可看出菌株 G 的近缘菌株是贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*); 菌株 H 的近缘菌株是阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhattai*)。6 株基因序列在 NCBI 数据库中的 Blast 同源性对比中与其近缘菌株相似度皆达 99% 以上, 最高可达 100%。

3 讨论与结论

3.1 讨论

黄曲霉(*Aspergillus flavus*)是普遍存在的腐生性真菌, 全世界每年约有 1/4 的食品会受到黄曲霉毒素的污染, 本研究表明紫薯在霉变后也有产生黄曲霉毒素的风险。对于哥氏枝孢霉还未见相关报道, 但对于枝孢霉属的研究表明枝孢菌(*Cladosporium link*)是广泛存在于自然界的一类真菌, 可侵染植物叶片和根茎, 造成果蔬及粮食作物产量降低, 也是苹果、生菜、猕猴桃、草莓等果蔬采后腐烂的主要致病菌^[19]。而热带青霉(*Penicillium tropicum*)和基督青霉(*Penicillium christenseniae*)属于青霉属, 青霉属菌分布较广, 在霉变的果实中, 较为普遍, 如意大利青霉菌(*Penicillium italicumwehmer*)是柑橘青霉病的病原菌^[20-21]。对于本研究分离到的热带青霉和基督青霉, 只有少量关于热带青霉基因改造、代谢产物及功效的药物开发研究, 未见这两株菌引起腐败方面的报道。这些相关研究结合本研究的致腐实验表明所分离到的 4 株真菌是紫薯腐败菌。与本研究结论相反, 相关研究表明贝莱斯芽孢杆菌和阿氏芽孢杆菌这两类芽孢杆菌对某些植物具有抗病害的作用。如贝莱斯芽孢杆菌对马铃薯的链霉菌有抗菌活性, 能保护双孢蘑菇作物免受由 *Trichoderma aggressivum* 引起的绿霉病, 有效控制小麦白粉病^[22]、花生白绢病^[23]、辣椒疫霉病菌^[24]等。阿氏芽孢杆菌

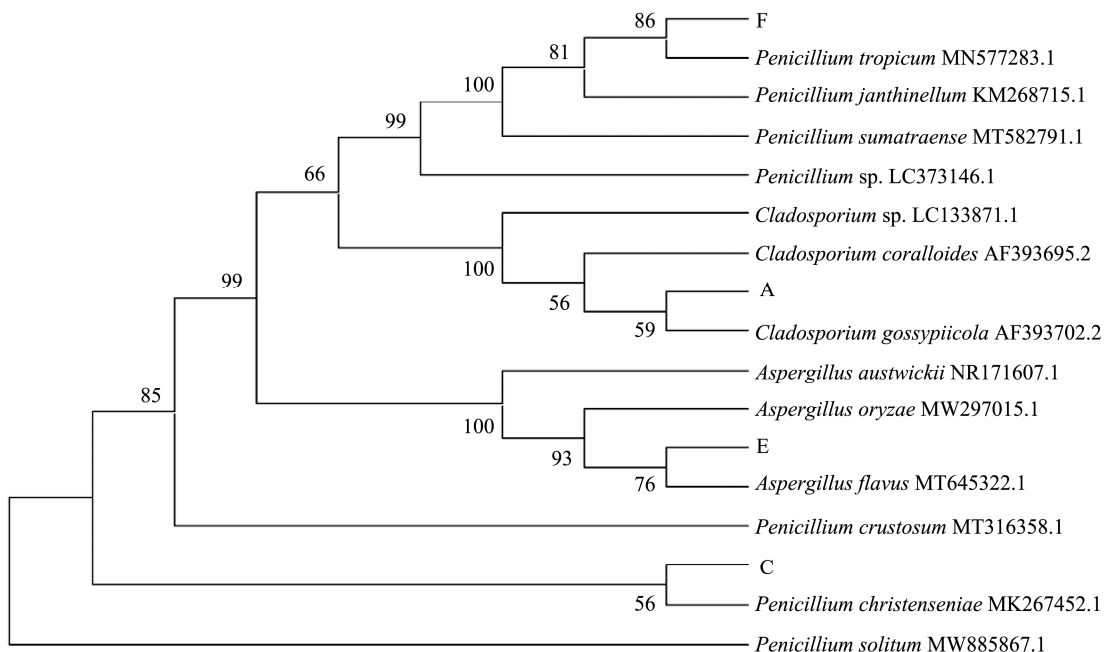


图 4 紫薯真核腐败菌的系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree of eukaryotic spoilage bacteria of *Solanum tuberosum*

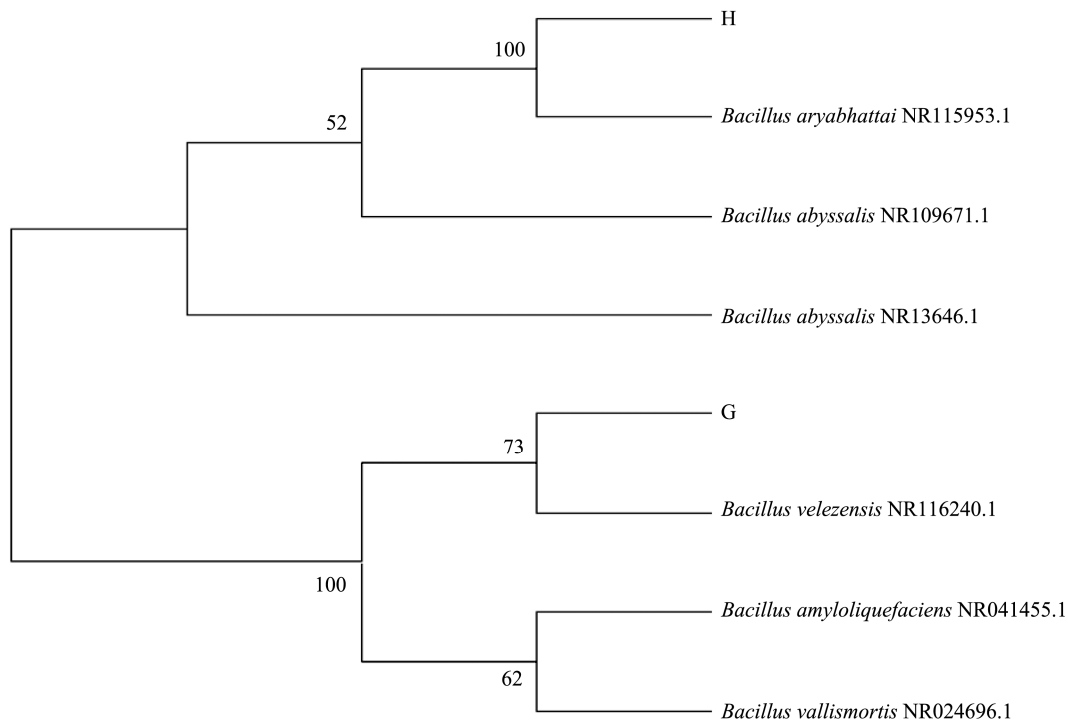


图 5 紫薯原核腐败菌的系统发育树
Fig.5 Phylogenetic tree of prokaryotic spoilage bacteria of *Solanum tuberosum*

可以防治水稻^[25]、小麦^[26]、烟草^[27]等作物的病害, 还能改善土壤养分等^[25]。但也有报道阿氏芽孢杆菌可降解木质素, 这可能与紫薯腐败有关。本研究将分离到的这两种菌株分

别单独反接种紫薯后, 出现菌体生长, 导致紫薯软烂、发黑, 说明这两株菌确实能引起紫薯腐烂, 可能原因为本研究分离到的与报道的菌株的基因组不完全相同, 代谢有差

异;另外微生物的生长代谢及影响因素是极其复杂的过程,除了微生物自身的遗传因素外,还受到温度、湿度、空气流速、环境微生物等外在因素影响^[28],这些因素相互联系、彼此作用,而本研究只是在单菌株、特定条件下,研究菌株的致病性,没有设定菌种的相互作用,所得到的结论有一定的局限性,菌种间会因竞争、共生等关系而改变代谢途径,从而抑制或加速紫薯的腐败。目前对于蔬菜腐败机制的研究还较少,本研究所分离出的腐败菌对紫薯的致病机制仍需进一步探究。

本研究为后续紫薯防腐保鲜奠定了基础。相关研究表明芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌、链霉菌和一些海洋微生物,对黄曲霉菌有一定抑制作用^[29],醛类、黄酮类、烯类、醇及有机酸类等天然产物及植物精油对黄曲霉生长及产毒有明显的抑制作用^[30-33];芽孢杆菌、短芽孢杆菌等细菌对枝孢菌有明显的抑菌效果^[34],土槿皮和黄连水提物对枝孢样枝孢霉有抑菌和杀菌作用^[35],利用 O₂/CO₂ 自发气调能显著降低从猕猴桃上分离到的枝孢菌的活力和再生长能力,并降低其致病能力^[19];牛至、桂皮、丁香、百里香、鼠尾草和迷迭香等精油对柑橘主要致病菌意大利青霉和指状青霉(*Penicillium digitatum*)有抑制作用。本研究可借鉴这些研究成果,利用拮抗微生物、植物精油等天然产物对紫薯进行综合防腐研究,达到紫薯保鲜的目的,并进一步对这些腐败菌的致病机制进行研究,测定相关代谢产物,阐明这些菌株在紫薯腐败过程中的作用。此外也有相关研究表明,热带青霉、基督青霉的代谢产物有独特的药理作用^[36-37],如基督青霉具有独特钙调蛋白和 β-微管蛋白^[38],对疾病治疗、植物的生长和发育等过程起到重要作用,因此也可以利用本次分离到的菌种进行药物开发。

3.2 结 论

紫薯上的腐败菌会导致紫薯产生强烈的腐败气味,表面出现菌体生长,并且出现软烂、发黑状况,影响销售和食品安全,甚至影响人类的身体健康。本研究通过对腐败紫薯上的腐败菌进行分离,最终分离出 6 株菌株,这 6 株菌株在新鲜紫薯反接种时皆出现明显的腐败现象,通过反接种到新鲜紫薯上验证 6 种菌株的致病性,并且从系统发育树得到的近源菌与分离菌株的形态学情况基本一致,最终得出菌株 A 是哥氏枝孢霉,菌株 C 是基督青霉,菌株 E 是黄曲霉,菌株 F 是热带青霉,菌株 G 是贝莱斯芽孢杆菌,菌株 H 是阿氏芽孢杆菌。

参考文献

[1] RAN IY, INHWAN K, JIHYUN L. Phenolic composition and antioxidant activity of purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.): Varietal comparisons and physical distribution [J]. Antioxidants, 2021,

10(3): 462.

- [2] ZHANG X, YANG Y, WU ZF, *et al.* The modulatory effect of anthocyanins from purple sweet potato on human intestinal microbiota *in vitro* [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(12): 2582–2590.
- [3] FROND AD, LUHAS CI, STIRBU I, *et al.* Phytochemical characterization of five edible purple-reddish vegetables: Anthocyanins, flavonoids, and phenolic acid derivatives [J]. Molecules, 2019, 24(8): 1536.
- [4] SUN HJ, ZHANG PP, ZHU YS, *et al.* Antioxidant and prebiotic activity of five peonidin-based anthocyanins extracted from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) [J]. Sci Rep, 2016, 64(12): 5018.
- [5] GUO L, LIU J, YANG Y, *et al.* Purple sweet potato anthocyanins elicit calcium overload-induced cell death by inhibiting the calcium-binding protein S100A4 in acute lymphoblastic leukemia [J]. Food Biosci, 2021, (42): 101214.
- [6] ZHAO JG, YAN QQ, LU LZ, *et al.* *In vivo* antioxidant, hypoglycemic, and anti-tumor activities of anthocyanin extracts from purple sweet potato [J]. Nutr Res Pract, 2013, 7(5): 359–365.
- [7] GÉRARD V, EMEL A, FABRICE MS, *et al.* Thermal and photochemical stability of anthocyanins from black carrot, grape juice, and purple sweet potato in model beverages in the presence of ascorbic acid [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(19): 5647–5660.
- [8] 楚良慧, 宋帅, 张红, 等. 紫薯的营养价值及其脱毒快繁技术研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2018, 24(24): 34–35, 42.
- CHU LH, SONG S, ZHANG H, *et al.* Advances in nutritional value of purple potato and its detoxification and rapid propagation techniques [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2018, 24(24): 34–35, 42.
- [9] LI WL, YU HY, ZHANG XJ, *et al.* Purple sweet potato anthocyanin exerts antitumor effect in bladder cancer [J]. Oncol Rep, 2018, 40(1): 73–82.
- [10] 陆建珍, 徐雪高, 汪翔, 等. 中国紫甘薯产业发展分析 [J]. 农业展望, 2020, 16(8): 81–89.
- LU JZ, XU XG, WANG X, *et al.* Analysis of purple sweet potato industry in China [J]. Agric Outlook, 2020, 16(8): 81–89.
- [11] 韩聪聪. 红薯、紫薯、凉薯贮藏品质调控研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2018.
- HAN CC. Study on storage quality control of the red sweetpotato, purple sweetpotato and jicama [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018.
- [12] 孙江丽, 唐仙, 杨佳琪, 等. 碳酸钠对甘薯软腐病菌的抑制及致死作用研究 [J]. 食品工业, 2022, 43(6): 176–181.
- SUN JL, TANG X, YANG JQ, *et al.* Inhibition and lethal effect of sodium carbonate on soft rot pathogen from sweet potato [J]. Food Ind, 2022, 43(6): 176–181.
- [13] 段鹏, 张义正, 谭雪梅. 甘薯块根腐烂真菌的分离和鉴定 [J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(2): 260–263.
- DUAN P, ZHANG YZ, TAN XM. Isolation and identification of fungi from rotted tuber of sweet potato [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2011, 17(2): 260–263.

- [14] 高波, 王容燕, 马娟, 等. 甘薯爪哇黑腐病的病原鉴定[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 200–204, 209.
GAO B, WANG RY, MA J, *et al.* Pathogen identification of java black rot disease on sweet potato [J]. Plant Protect, 2016, 42(5): 200–204, 209.
- [15] 王宏勋, 黄娜丽, 侯温甫. 不同脂肪比例的冷鲜猪肉馅中菌相组成比较研究[J]. 中国酿造, 2013, 32(2): 92–94.
WANG HX, HUANG NL, HOU WF. Comparison of microflora in cold fresh ground pork with different fat percentage [J]. China Brew, 2013, 32(2): 92–94.
- [16] R.E. 布坎南, N.E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 1984.
- [17] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
WEI JC. Fungal identification manual [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1979.
- [18] 中国科学院. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
Chinese Academy of Sciences. Common and common used fungi [M]. Beijing: Science Press, 1978.
- [19] 张玉笑, 刘莎莎, 王亮, 等. 主动自发气调对枝孢菌的抑制效果[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 185–191.
ZHANG YX, LIU SS, WANG L, *et al.* Inhibitory effect of active modified atmosphere on *Cladosporium link* [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2021, 21(1): 185–191.
- [20] 梁攀, 李悦妍, 黄少云, 等. 柑橘类水果贮藏保鲜技术研究进展[J]. 包装工程, 2021, 42(13): 57–66.
LIANG P, LI YY, HUANG SY, *et al.* Research progress of postharvest storage and preservation technology of citrus fruits [J]. Pack Eng, 2021, 42(13): 57–66.
- [21] 王淑培. 桔梅奇酵母 *Metschnikowia citriensis* 对柑橘果实采后酸腐病的控制效果及作用机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
WANG SP. Biocontrol ability and action mechanism of *Metschnikowia citriensis* against *Geotrichumcitri-aurantii* causing sour rot of postharvest citrus fruit [D]. Chongqing: Southwest University, 2020.
- [22] 张彩文, 程坤, 张欣, 等. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)分类学及功能研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(17): 258–265.
ZHANG CW, CHENG K, ZHANG X, *et al.* Taxonomy and functions of *Bacillus velezensis*: A review [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(17): 258–265.
- [23] 潘梦诗, 郭文阳, 张宗源, 等. 贝莱斯芽孢杆菌对花生白绢病的防治效果[J]. 生物学杂志, 2022, 39(1): 37–41.
PAN MS, GUO WY, ZHANG ZY, *et al.* Biocontrol effects of *Bacillus velezensis* on peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* [J]. J Biol, 2022, 39(1): 37–41.
- [24] 崔文会, 炊春萌, 孙雪, 等. 贝莱斯芽孢杆菌对果蔬土传病害的抑菌效果研究[J]. 工业微生物, 2020, 50(5): 15–20.
CUI WH, CHUI CM, SUN X, *et al.* Bacteriostatic effects of *Bacillus velezensis* on soil-borne diseases of fruits and vegetables [J]. Ind Microbiol, 2020, 50(5): 15–20.
- [25] 熊乙, 欧翔, 贾蓉, 等. 阿氏芽孢杆菌应用研究进展[J]. 生物技术, 2018, 28(3): 302–306.
XIONG Y, OU X, JIA R, *et al.* Research progress in application of *Bacillus aryabhattai* [J]. Biotechnol, 2018, 28(3): 302–306.
- [26] 刘军生, 解修超, 罗阳兰, 等. 抗镉内生细菌阿耶波多氏芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 生物技术通报, 2019, 35(2): 64–72.
LIU JS, XIE XC, LUO YL, *et al.* Isolation, identification, and biological characteristics of a cadmium-resistant endophytic bacteria *Bacillus aryabhattai* [J]. Biotechnol Bull, 2019, 35(2): 64–72.
- [27] 武芳, 李勇, 路兆军. 盐碱土壤中微生物菌株的分离、筛选与功能评价[J]. 安徽农学通报, 2019, 25(23): 24–27, 35.
WU F, LI Y, LU ZJ. Isolation, screening and functional evaluation of microbial strains in saline alkali soil [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2019, 35(23): 24–27, 35.
- [28] 刘绪, 李欢, 黄潇潇, 等. 改良浸钙法对甜樱桃保鲜效果的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2021, 48(3): 390–396.
LIU X, LI H, HUANG XY, *et al.* Effect of modified calcium immersion treatment on preservation of sweet cheery [J]. J Anhui Agric Univ, 2021, 48(3): 390–396.
- [29] 王昌禄, 刘彤, 李王强, 等. 微生物对黄曲霉毒素的抑制机制研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(1): 27–36.
WANG CL, LIU T, LI WQ, *et al.* Research progress on inhibition mechanism of aflatoxins by microorganisms [J]. J Food Sci Technol, 2021, 39(1): 27–36.
- [30] 石程仁, 张初署, 杜咏梅, 等. 不同植物抑制剂对黄曲霉菌生长和产毒的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(8): 2892–2897.
SHI CR, ZHANG CS, DU YM, *et al.* Effects of different plant inhibitors on the growth and toxin production of *Aspergillus flavus* [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(8): 2892–2897.
- [31] 李倩, 赵颖, 朱晓曼, 等. 天然产物抑制黄曲霉生长及其产毒的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2021, 42(1): 132–140.
LI Q, ZHAO Y, ZHU XM, *et al.* Research progress of natural products' inhibition on the growth and aflatoxin synthesis of *Aspergillus flavus* [J]. J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed), 2021, 42(1): 132–140.
- [32] 马卫宾, 张迪, 谢岩黎, 等. 天然食用香料草蓆酸对黄曲霉的抑菌作用研究[J]. 粮油食品科技, 2020, 28(5): 6–10.
MA WB, ZHANG D, XIE YL, *et al.* Inhibitory effect of *trans*-2-methyl-2-pentenoic acid as a natural food flavor on *Aspergillus flavus* [J]. Sci Technol Cere Oils Foods, 2020, 28(5): 6–10.
- [33] 王龔, 林威, 俞根荣, 等. 植物精油在食品防腐保质中应用的研究进展[J]. 核农学报, 2021, 35(5): 1170–1177.
WANG Y, LIN W, YU GR, *et al.* Advance in anti-fungus application of plant essential oil in food preservation [J]. J Nucl Agric Sci, 2021, 35(5): 1170–1177.
- [34] 杨蕾, 伍建榕, 邓佳, 等. 蓝莓采后病害病原菌分离鉴定及其拮抗菌筛选[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2019, 48(2): 143–147.
YANG L, WU JR, DENG J, *et al.* Pathogen identification of rotten

- blueberry fruit in post-harvest and screening of antagonistic bacteria [J]. J Fujian Agric For Univ (Nat Sci Ed), 2019, 48(2): 143–147.
- [35] 尹皓, 韩和祥, 黄毅, 等. 四种中药水提物对枝孢样枝孢霉的体外抗菌活性试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021, (9): 135–138.
- YIN AI, HAN HX, HUANG Y, *et al.* *In vitro* antibacterial activity test of four kinds of water extracts of traditional Chinese medicine against *Cladosporium cladosporioides* [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2021, (9): 135–138.
- [36] 吕妍, 贾少杰, 戴好富, 等. 植物内生真菌 *Penicillium tropicum* 发酵产物中化学成分及其抑菌活性研究[J]. 陕西理工大学学报(自然科学版), 2020, 36(2): 76–80.
- LV Y, JIA SJ, DAI HF, *et al.* Antibacterial secondary metabolites from endophytic fungus *Penicillium tropicum* [J]. J Shanxi Univ Technol (Nat Sci Ed), 2020, 36(2): 76–80.
- [37] 赵佩佩, 刘海溶, 杨梦, 等. 青霉菌组蛋白去乙酰化酶基因的敲除及其次级代谢产物变化[J]. 山东科学, 2021, 34(1): 21–27.
- ZHAO PP, LIU HR, YANG M, *et al.* Histone deacetylase gene knockout in *Penicillium* and changes in secondary metabolite production [J].

Shandong Sci, 2021, 34(1): 21–27.

- [38] VISAGIE CM, HOUBRAKEN J, FRISVAD JC, *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium* [J]. Stud Mycol, 2014, 78: 343–371.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介



刘 绪, 硕士, 副教授, 主要研究方向为发酵工程、免疫学、软饮料工艺学、酿酒工艺学。

E-mail: 465685853@qq.com



张华玲, 硕士, 讲师, 主要研究方向为农产品保鲜、基因克隆、微生物酿造等。

E-mail: 3985151@qq.com