

霍佳欢,李双民,温晓蕾,等.不同培养条件对栗仁菌核青霉菌生长的影响[J].江苏农业科学,2021,49(23):129-132.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.23.023

# 不同培养条件对栗仁菌核青霉菌生长的影响

霍佳欢<sup>1,2</sup>,李双民<sup>3</sup>,温晓蕾<sup>1,2,4</sup>,冯丽娜<sup>1,2</sup>,李雅丽<sup>2</sup>,张娜娜<sup>2</sup>,兰淑慧<sup>1,2</sup>,齐慧霞<sup>1,2</sup>

(1.板栗产业技术教育部工程研究中心,河北秦皇岛 066004;

2.河北科技师范学院农学与生物科技学院/河北省特色园艺种质挖掘与创新利用重点实验室,河北昌黎 066600;

3.河北省昌黎县职业技术教育中心,河北昌黎 066600; 4.河北农业大学植物保护学院,河北保定 071002)

**摘要:**菌核青霉菌(*Penicillium sclerotiorum*)是板栗储藏期引起栗仁腐烂的主要致病菌之一。为明确该病菌生长及产孢的适宜环境条件,本试验采用生长速率法和血球计数法对不同营养、温度、pH 值、通气状况等条件下病菌的生长情况进行了研究。结果表明,最适宜栗仁菌核青霉菌菌丝生长和产孢的温度为 25 ℃,pH 值为 6,光照条件为全黑暗;沙堡弱培养基最适合该病菌菌丝生长,燕麦马铃薯培养基最适合产孢;菌核青霉菌在以木糖醇为基础碳源的培养基上菌落直径最大、产孢量最多;菌丝生长的最佳氮源为牛肉膏,产孢量最多的氮源为蛋白胨和酵母浸粉;菌丝体在 24 h 连续振荡的条件下生长的最好;50 ℃为菌核青霉菌致死温度。

**关键词:**板栗;栗仁腐烂病;菌核青霉菌;培养条件

**中图分类号:** S436.64 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)23-0129-04

栗仁腐烂病是板栗生产上的常见病害之一,在南北方各板栗产区均有发生,近年来因板栗产量的大幅度提高,栗仁腐烂率也随之增加,危害率高达 40%~50%,严重制约着板栗产业的发展<sup>[1-2]</sup>。栗仁腐烂病常发生于贮藏期间,多由病原微生物引起,常见的有镰刀菌属、链格菌属、单端孢属、青霉属以及曲霉属等<sup>[3]</sup>,其中青霉属在全国各板栗产区均可危害,造成栗仁发生青腐,产生褐色或青色的病斑,后期转为蓝绿色或青绿色<sup>[4]</sup>。目前板栗上已报道的青霉种类有小刺青霉、扩展青霉以及拟青霉等<sup>[5-7]</sup>,而对菌核青霉的研究相对较少。本试验对引起贮藏期栗仁腐烂的菌核青霉菌其适宜培养条件进行研究,以期制定有效的防腐保鲜措施提供科学依据,减少不必要的经济损失。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验于 2019—2020 年在河北科技师范学院植物保护实验室开展。栗仁菌核青霉菌(*Penicillium sclerotiorum*)由河北科技师范学院植物保护实验室提供。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 培养基对菌核青霉菌菌丝生长和产孢的影响** 在无菌超净台内,将直径 5 mm 的栗仁菌核青霉菌菌饼分别接种到玉米粉、胡萝卜、番茄、沙堡弱、燕麦马铃薯、绿豆、肉汁胨、板栗培养基平板中央,每种培养基各设 3 个重复,均于 25 ℃全黑暗条件下培养。每间隔 24 h 采用交叉法<sup>[8]</sup>测量菌落直径,菌落生长 14 d 时采用血球计数法测定孢子数量<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.2 温度对菌核青霉菌菌丝生长和产孢的影响

超净台内将直径为 5 mm 的栗仁菌核青霉菌菌饼接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基中央,分别放置于 5、10、15、20、25、30、35 ℃全黑暗培养箱中培养,每个温度均设 3 次重复,菌落直径和产孢量的测量方法同“1.2.1”节。

#### 1.2.3 光照对菌核青霉菌菌丝生长和产孢的影响

超净台内将直径为 5 mm 的栗仁菌核青霉菌菌饼接种于 PDA 平板中央,设置不同光照(24 h 光照、

收稿日期:2021-03-25

基金项目:国家重点研发计划(编号:2020YFD1000700);河北省教育厅平台项目(河北省板栗产业协同创新中心,2019—2023 年)。

作者简介:霍佳欢(1997—),女,河北廊坊人,硕士研究生,研究方向为板栗病害流行与防控,E-mail:2469634717@qq.com;共同第一作者:李双民(1968—),男,河北昌黎人,中学高级教师,研究方向为果树病虫害防治,E-mail:lishuangmin2021@163.com。

通信作者:温晓蕾,硕士,实验师,研究方向为分子植物病理学,E-mail:xiaoleiwen@sina.com;齐慧霞,硕士,教授,研究方向为植物病害流行与防控,E-mail:qihuix@163.com。

12 h 光照/黑暗、24 h 黑暗) 条件, 25 ℃ 下培养, 每个处理重复 3 次。菌落直径和产孢量的测量方法同“1.2.1”节。

1.2.4 不同 pH 值对菌核青霉菌菌丝生长和产孢的影响 用 0.1 mol/L HCl 和 NaOH 溶液调节 PDA 培养基的 pH 值, 制成 pH 值为 5、6、7、8、9、10、11 的 7 种不同培养基, 将直径为 5 mm 的栗仁菌核青霉菌菌饼接种于 PDA 平板中央, 在 25 ℃ 全黑暗条件下进行培养, 每种 pH 值设 3 次重复, 菌落直径和产孢量的测量方法同“1.2.1”节。

1.2.5 碳源对菌核青霉菌菌丝生长和产孢的影响 将察氏培养基作为基础培养基, 分别用等量的肌醇、可溶性淀粉、葡萄糖、果糖、甘露醇、木糖醇和乳糖替换察氏培养基中的蔗糖<sup>[10]</sup>, 将直径为 5 mm 的栗仁菌核青霉菌菌饼接种于平板中央, 每种碳源设 3 个重复, 25 ℃ 全黑暗条件下培养。菌落直径和产孢量的测量方法同“1.2.1”节。

1.2.6 氮源对菌核青霉菌菌丝生长和产孢的影响 基础培养基同上, 以等量的牛肉膏、硫酸铵、硝酸钾、蛋白胨、酵母浸粉和氯化铵替换察氏培养基中硝酸钠<sup>[10]</sup>, 将直径为 5 mm 的栗仁菌核青霉菌菌饼接种于平板中央, 每个处理重复 3 次, 25 ℃ 黑暗下培养。菌落直径和产孢量的测量方法同“1.2.1”节。

1.2.7 通气状况对菌丝生长的影响 将液体 PDA 培养基分装到三角瓶中, 每瓶 100 mL, 将 3 个直径为 0.5 mm 的栗仁菌核青霉菌菌饼在超净台内接种到三角瓶内, 在温度为 25 ℃, 转速为 120 r/min 摇床内分别 24 h 振荡、12 h 振荡/12 h 静止、24 h 静止培养 5 d, 每个处理设 3 次重复。5 d 以后, 将菌丝通过纱布过滤, 用烘箱烘干(直到不含有任何水分), 称量菌丝干质量<sup>[11]</sup>。

1.2.8 致死温度的测定 菌核青霉菌生长初期, 未产孢之前(2 d 以内)转入装有 5 mL 无菌水的试管中, 每个处理标好编号, 设置 3 个重复, 将各试管按照不同编号依次放入 40、45、50、55、60、65 ℃ 水浴锅中, 水浴 10 min, 然后将处理后的菌饼接种到 PDA 培养平板中央。25 ℃ 培养 48 h 后观察菌丝生长情况, 明确致死温度。

## 2 结果与分析

2.1 培养基对菌核青霉菌菌丝生长、产孢的影响

由表 1 可知, 栗仁菌核青霉菌在 8 种培养基上均可生长, 最适合菌核青霉菌生长的培养基为沙堡

弱培养基, 14 d 菌落直径达 7.95 cm; 其次为板栗培养基, 菌落直径可达 6.98 cm。适宜菌核青霉菌产孢的培养基为燕麦马铃薯培养基, 培养 14 d 产孢量可达  $6.99 \times 10^5$  个/皿。表明沙堡弱培养基最适合菌丝生长, 燕麦马铃薯培养基最适合产孢。

表 1 培养基对菌核青霉菌菌丝生长、产孢的影响		
培养基	菌落直径 (cm)	产孢量 ( $10^5$ 个/皿)
沙堡弱	7.95 ± 0.05a	4.29 ± 0.44b
燕麦马铃薯	6.87 ± 0.08c	6.99 ± 0.56a
板栗	6.98 ± 0.08b	5.17 ± 0.82b
绿豆	6.53 ± 0.03d	2.53 ± 0.17c
胡萝卜	6.15 ± 0.05e	4.88 ± 0.92b
番茄	5.65 ± 0.10g	2.83 ± 0.17c
玉米粉	4.88 ± 0.06h	2.00 ± 0.16c
肉汁胨	5.87 ± 0.03f	2.64 ± 0.64c

注: 同列数据后不同小写字母表示在 5% 水平的差异显著。下同。

2.2 温度对菌核青霉菌菌丝生长、产孢的影响

由表 2 可知, 温度对病原菌菌丝生长和产孢量均有显著影响, 栗仁菌核青霉菌在 10 ~ 30 ℃ 条件下均能生长, 最佳的生长温度范围在 20 ~ 30 ℃, 其中在 25 ℃ 条件下菌落生长最好, 14 d 时菌落直径可达到 6.33 cm; 同时 25 ℃ 也最适合产孢, 14 d 时产孢量为  $3.76 \times 10^5$  个/皿。温度低于 5 ℃ 或高于 35 ℃ 时菌落生长十分缓慢, 略有菌丝产生。

表 2 温度对菌核青霉菌菌丝生长、产孢量的影响		
温度	菌落直径 (cm)	产孢量 ( $10^5$ 个/皿)
25 ℃	6.33 ± 0.06a	3.76 ± 0.45a
30 ℃	4.62 ± 0.26b	2.85 ± 0.14b
20 ℃	4.12 ± 0.51c	2.85 ± 0.17b
15 ℃	2.87 ± 0.08d	2.60 ± 0.17b
10 ℃	1.37 ± 0.19e	1.72 ± 0.18c
5 ℃	0.00 ± 0.00f	0.00 ± 0.00d
35 ℃	0.00 ± 0.00f	0.00 ± 0.00d

2.3 光照对菌核青霉菌菌丝生长、产孢的影响

由表 3 可知, 在 3 种不同光照条件下, 栗仁菌核青霉菌以全黑暗条件下生长最快, 14 d 时菌落直径达 6.8 cm。24 h 光照和 12 h 光照/黑暗条件下菌落直径相对较小, 分别为 6.02 cm 和 5.83 cm, 且这 2 处理对菌核青霉菌菌丝生长的影响无显著差异。全黑暗、全光照和 12 h 光照/黑暗 3 个处理对菌核青霉菌产孢量影响无显著差异, 14 d 时产孢量分别

为  $3.95 \times 10^5$ 、 $3.63 \times 10^5$ 、 $3.73 \times 10^5$  个/皿。表明菌核青霉菌在黑暗条件下更易于菌丝生长和产孢。

表 3 光照对菌核青霉菌菌丝生长、产孢的影响

温度	菌落直径 (cm)	产孢量 ( $10^5$ 个/皿)
24 h 黑暗	$6.80 \pm 0.09a$	$3.95 \pm 0.33a$
24 h 光照	$6.02 \pm 0.08b$	$3.63 \pm 0.20a$
12 h 光照/黑暗	$5.83 \pm 0.20b$	$3.73 \pm 0.36a$

## 2.4 不同 pH 值对菌核青霉菌菌丝生长、产孢的影响

栗仁菌核青霉菌在 7 种不同 pH 值上生长状态如表 4 所示,最适宜栗仁菌核青霉菌菌丝生长和产孢的 pH 值为 6,培养 14 d 菌落直径达 6.62 cm;产孢量为  $3.70 \times 10^5$  个/皿。pH 值为 11 时,菌落生长较慢,培养 14 d 菌落直径为 5.93 cm;pH 值为 5 时,不适宜其产孢,培养 14 d 产孢量为  $2.35 \times 10^5$  个/皿。

表 4 pH 值对菌核青霉菌菌丝生长、产孢的影响

pH 值	菌落直径 (cm)	产孢量 ( $10^5$ 个/皿)
5	$6.35 \pm 0.18c$	$2.35 \pm 0.38c$
6	$6.62 \pm 0.10a$	$3.70 \pm 0.60a$
7	$6.57 \pm 0.08ab$	$3.35 \pm 0.48ab$
8	$6.47 \pm 0.06abc$	$3.35 \pm 0.41ab$
9	$6.48 \pm 0.10abc$	$3.15 \pm 0.34abc$
10	$6.42 \pm 0.03bc$	$3.00 \pm 0.45abc$
11	$5.93 \pm 0.10d$	$2.63 \pm 0.40bc$

## 2.5 碳源对菌核青霉菌菌丝生长、产孢的影响

由表 5 可知,菌核青霉菌在 8 种不同碳源上均能生长,菌丝在以木糖醇为碳源的培养基上生长的最好,菌落直径最大、产孢量最多,培养 14 d 菌落直径为 6.02 cm,产孢量为  $4.27 \times 10^5$  个/皿;菌丝对可溶性淀粉的利用能力最低,培养 14 d 菌落直径仅为 3.45 cm。

表 5 碳源对菌核青霉菌菌丝生长、产孢的影响

碳源	菌落直径 (cm)	产孢量 ( $10^5$ 个/皿)
木糖醇	$6.02 \pm 0.21a$	$4.27 \pm 0.11a$
葡萄糖	$4.82 \pm 0.08c$	$2.71 \pm 0.37b$
甘露醇	$5.10 \pm 0.43c$	$1.15 \pm 0.17c$
蔗糖	$5.55 \pm 0.23b$	$2.20 \pm 0.98bc$
果糖	$4.90 \pm 0.18c$	$1.93 \pm 0.19bc$
肌醇	$4.72 \pm 0.03cd$	$2.13 \pm 0.11bc$
乳糖	$4.42 \pm 0.13d$	$1.28 \pm 0.24c$
可溶性淀粉	$3.45 \pm 0.10e$	$1.85 \pm 0.34bc$

## 2.6 氮源对菌核青霉菌菌丝生长、产孢的影响

由表 6 可知,栗仁菌核青霉菌在以牛肉膏、蛋白胨和硫酸铵为基础氮源的培养基上生长的好,其中以牛肉膏的利用率最高,14 d 时的菌落直径为 7.68 cm;该病菌在以酵母浸粉和硝酸钠为基础氮源的培养基上菌落扩展相对较慢。供试氮源培养基中以蛋白胨和酵母浸粉的产孢数量大,14 d 时产孢量分别为  $4.79 \times 10^5$ 、 $4.80 \times 10^5$  个/皿,二者之间无显著差异。

表 6 氮源对菌核青霉菌菌丝生长、产孢的影响

氮源	菌落直径 (cm)	产孢量 ( $10^5$ 个/皿)
牛肉膏	$7.68 \pm 0.08a$	$3.26 \pm 0.21c$
氯化铵	$6.65 \pm 0.13b$	$4.23 \pm 0.22b$
蛋白胨	$7.52 \pm 0.23a$	$4.79 \pm 0.12a$
硫酸铵	$7.48 \pm 0.23a$	$4.24 \pm 0.26b$
硝酸钾	$6.42 \pm 0.15bc$	$3.70 \pm 0.48c$
酵母浸粉	$6.17 \pm 0.19c$	$4.80 \pm 0.16a$
硝酸钠	$6.15 \pm 0.18c$	$4.61 \pm 0.1ab$

## 2.7 通气状况对菌核青霉菌生长的影响

由图 1 可知,菌核青霉菌在不同通气状况下菌丝生长有较为显著的差异,该病菌在 24 h 振荡条件下菌丝生长的最好,培养 5 d 菌丝干质量可达 0.40 g;在 24 h 静止和 12 h 振荡/12 h 静止下该病菌菌丝生长相对较慢,5 d 时菌丝干质量分别为 0.21 g 和 0.16 g,由此可见菌核青霉菌在通气良好的条件下更适宜生长。

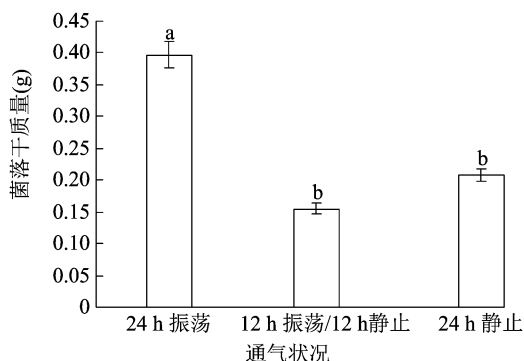
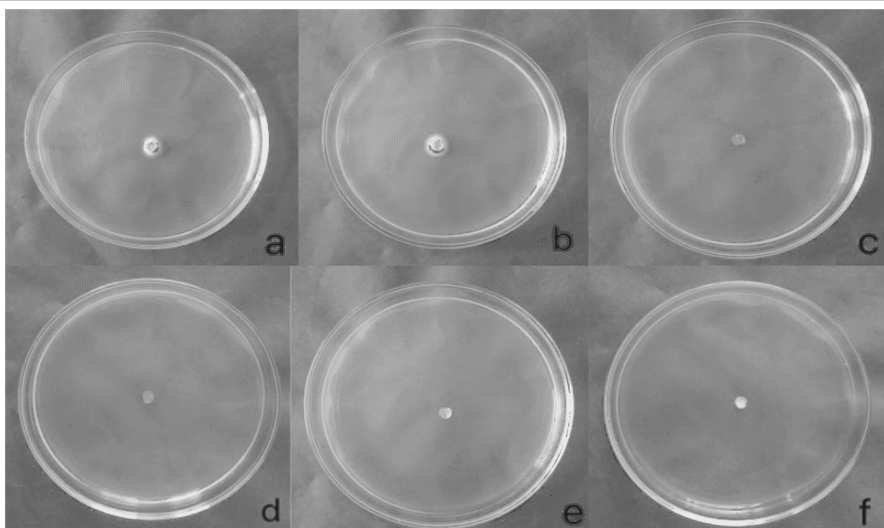


图 1 通气状况对菌核青霉菌生长的影响

## 2.8 致死温度测定结果

将栗仁菌核青霉菌菌饼分别在 40、45、50、55、60、65 ℃ 不同温度的水浴锅中处理 10 min 后,转移到 PDA 平板中央 25 ℃ 培养 48 h,结果(图 2)表明,在 40 ℃ 和 45 ℃ 条件下处理的菌丝均可继续生长,在 50、55、60、65 ℃ 条件下处理过的菌丝则停止生长。因此可确定栗仁菌核青霉菌菌丝的致死温度为 50 ℃。



a~f 温度分别为 40、45、50、55、60、65℃

图2 菌核青霉菌的致死温度

### 3 结论与讨论

本试验结合菌丝生长量和产孢量 2 个标准来衡量菌核青霉菌的适宜培养条件。研究发现,沙堡弱培养基最适合菌核青霉菌菌丝生长,燕麦马铃薯培养基最适合产孢;最适宜菌丝生长和产孢的温度为 25℃,pH 值为 6,光照条件为全黑暗;栗仁菌核青霉菌对木糖醇的利用率最高,在以木糖醇为基础碳源的培养基上菌丝最适宜生长、产孢量最大;氮源中最适宜菌丝生长的为牛肉膏,但最适宜产孢的为酵母浸粉和蛋白胨;在 24 h 连续振荡培养条件下最适合菌丝生长,培养 5 d 后菌落干质量达 0.40 g。

郜海燕等指出,最适合扩展青霉生长的 pH 值为 8,最适宜菌丝生长的碳源为可溶性淀粉,氮源为酵母浸粉,这与菌核青霉略有不同<sup>[12]</sup>。王俊凤等认为小刺青霉菌最适宜的生长温度为 20℃,pH 值为 7,最适宜菌丝生长和产孢的碳源分别为可溶性淀粉和甘露醇;同时适宜菌丝生长和产孢的氮源为酵母浸粉<sup>[5]</sup>。菌核青霉菌和小刺青霉菌虽同为青霉属,且均为腐烂病的致病菌,但二者适宜生长条件具有一定差异,可能因病菌生长环境和种间差异所引起。丁仁惠等研究发现指状青霉和意大利青霉的致死温度分别为 80℃和 75℃,与菌核青霉的致死温度 50℃略有不同,此差异可能是因生长环境不同或因寄主不同所导致<sup>[13]</sup>。本研究明确了栗仁菌核青霉菌对环境 and 营养条件的需求,为有效预防和防治由菌核青霉菌引起的栗仁腐烂病提供理论支撑,具体防腐方法还需进一步研究探讨。

### 参考文献:

- [1] 梁丽松,王贵禧. 不同产区板栗病原菌的种类及其致病力研究[J]. 林业科学研究,2003,16(3):284-288.
- [2] 王海霞,刘正坪,朱晓清,等. 板栗贮藏期致病病原真菌种类鉴定及其侵染特性[J]. 北京农学院学报,2006,21(4):33-36.
- [3] 吴光金,易润华. 板栗致腐微生物种群鉴定[J]. 中南林学院学报,2000,20(4):58-61.
- [4] 赵学平,贝亚维,王强,等. 板栗贮藏期病害发生规律研究[J]. 植物保护,2000,26(4):29-31.
- [5] 王俊凤,温晓蕾,孙伟明,等. 板栗腐烂病小刺青霉菌(*Penicillium spinulosum*)培养条件及药剂筛选[J]. 中国农业科技导报,2020,22(3):79-84.
- [6] 侯保林,张志铭,杨兴民,等. 河北板栗种仁斑点类病害研究[J]. 河北农业大学学报,1988,11(2):11-22.
- [7] 梁宗琦,韩燕峰,刘爱英,等. 拟青霉(*Paecilomyces* Bainier),一类应用前景广阔的真菌资源[J]. 菌物系统,2003,22(增刊1):17-23.
- [8] 曹星星. 铁皮石斛病原真菌分离与鉴定及印度梨形孢促生作用研究[D]. 杭州:浙江大学,2015.
- [9] 李爱华,岳思君,马海滨. 真菌孢子三种计数方法相关性的探讨[J]. 微生物学杂志,2006,26(2):107-110.
- [10] 杨成前,吴中宝,余中莲,等. 重庆市白术根腐病发生危害及其病原菌生物学特性[J]. 南方农业学报,2018,49(8):1561-1567.
- [11] 姜小玉,台莲梅,刘凤艳,等. 水稻谷粒褐变致病菌禾谷镰孢菌丝生长特性研究[J]. 安徽农学通报,2015,21(18):70-72.
- [12] 郜海燕,肖尚月,陈杭君,等. 蓝莓采后主要病原真菌的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 农业机械学报,2017,48(5):327-334.
- [13] 丁仁惠,何小娥,王文龙,等. 柑橘采后主要病原菌的生物学特性研究[J]. 湖南农业科学,2018(12):76-81.