

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2022.06.025

祁智慧, 张海洋, 田琳, 等. 基于形态特征和多基因序列鉴定储藏稻谷的优势真菌[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(6): 198-209.

QI Z H, ZHANG H Y, TIAN L, et al. Established prediction models of bread sensory evaluation results based on data analysis methods[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(6): 198-209.

基于形态特征和多基因序列鉴定 储藏稻谷的优势真菌

祁智慧^{1,2}, 张海洋^{1,2}, 田琳^{1,2}, 庄媛^{1,3}, 李冰^{1,3}, 唐芳^{1,2}✉

1. 国家粮食和物资储备局科学研究院 粮食储运研究所, 北京 100037;
2. 粮食储运国家工程研究中心, 北京 102209;
3. 北京农学院 生物资源与环境学院, 北京 102206)

摘要: 稻谷储藏期间, 真菌生长会影响稻谷质量, 严重时会产生真菌毒素, 引起食品安全问题。确定储藏期间稻谷的真菌群落组成并准确鉴定优势真菌, 是实现有效防控危害真菌的前提, 对于保障稻谷的品质和食品安全具有重要意义。基于此, 利用传统的微生物分离培养方法, 确定了不同地区粮仓内储存稻谷的真菌群落组成, 并结合模式菌株和国际权威菌株序列, 采用形态学观察及多基因联合系统发育分析方法准确鉴定我国储藏稻谷的优势种。结果表明, 南方地区优势种为黄曲霉 *Aspergillus flavus*、黑曲霉 *A. niger* 和蒙地曲霉 *A. montevidensis* (阿姆斯特丹曲霉 *A. amstelodami*), 北方地区优势种是多育曲霉 *Aspergillus proliferans* 和蒙地曲霉 *A. montevidensis*。并阐述了南北方储藏稻谷主要优势种的详细鉴定过程及相关资料, 为粮食中主要危害真菌物种的准确鉴定提供参考。

关键词: 稻谷; 储藏; 优势真菌; 鉴定; 曲霉属

中图分类号: S-3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2022)06-0198-12

Identification of Dominant Fungal Species on Stored Rice Grains by Morphological Characteristics and Multigene Analysis

QI Zhi-hui^{1,2}, ZHANG Hai-yang^{1,2}, TIAN Lin^{1,2}, ZHUANG Yuan^{1,2}, LI Bing^{1,3}, TANG Fang^{1,2}✉

1. Institute of Grain Storage and Logistics, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China; 2. National Engineering Research Center of Grain Storage and Logistics, Beijing 102206, China; 3. College of Bioscience and Resources Environment, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: The growth of fungi on rice grains during storage will affect rice quality. In severe cases, these fungi will produce mycotoxins and cause food safety issues. It is the premise of effective prevention and control of deleterious fungi to determine the fungal community composition of rice grains during storage and accurately identify the dominant species, which is of great significance in ensuring the quality safety and

收稿日期: 2022-07-17

基金项目: 中央级公益性基本科研业务费专项 (ZX2202)

Supported by: Fundamental Research Funds of non-profit Central Institutes (No. ZX2202)

作者简介: 祁智慧, 女, 1992年出生, 硕士, 助理研究员, 研究方向为粮食微生物。E-mail: qzh@ags.ac.cn.

通讯作者: 唐芳, 女, 1978年出生, 硕士, 副研究员, 研究方向为粮食微生物。E-mail: tf@ags.ac.cn.

food safety of rice grains. In this study, we used the methods of traditional microbial separation culture to investigate the fungal communities of stored rice grains from warehouses of different regions. In combination with the sequence of ex-types and authentic strains, we used morphological observations and multigene phylogenetic analysis to accurately identify the dominant fungal species of stored rice grains in China. The dominant species were *A. flavus*, *A. niger* and *A. montevicensis* (*A. amstelodami*) in Southern China and *A. proliferans* and *A. montevicensis* in Northern China. The detailed identification process and related data of the predominant fungal species on the stored rice grains in the North and South China were expounded in this paper, which has provided a reference for the accurate identification of deleterious fungi in grains.

Key words: rice grains; storage; dominant fungi; identification; *Aspergillus*

国家统计局关于 2020 年粮食产量的公告数据显示, 稻谷产量约占我国粮食总产量的三分之一, 是主要粮食作物, 也是重要的战略储备粮种。相较于小麦和玉米而言, 稻谷具有不耐储藏的性质, 一般在粮库储备轮换年限为 3 年^[1]。在收购、储藏和加工过程中, 外界环境中的微生物会对稻谷的品质带来一定影响^[2]。尤其是在粮库储藏时粮仓内的粮堆是一个复杂的生态系统, 仓内外环境温湿度的变化, 会导致水分迁移而使粮堆局部出现结露的情况, 从而为真菌的萌发生长创造有利条件, 可能导致储粮风险^[3-4]。

早在 2001 年, Reddy 等^[5]总结了水稻中报道过的 143 种不同的真菌, 结果表明无论是在田间还是在储藏期, 稻谷上都存在大量真菌。储藏期间稻谷的优势真菌主要为曲霉属 *Aspergillus* 物种^[6]。包括黄曲霉 *A. flavus*、黑曲霉 *A. niger*、亮白曲霉 *A. candidus* 等^[7]。曲霉属 *Aspergillus* 内不同真菌物种之间, 生长条件及产毒特性差异较大, 对稻谷的危害程度不同^[8], 准确鉴定主要优势真菌物种, 对于粮食霉变及真菌毒素污染精准防控具有重要意义。

早期粮食上真菌的鉴定多以形态特征鉴定为主, 部分种属的鉴定结果可能存在不准确^[9]。随着分子生物学的建立与发展, 现代分子生物学技术手段被逐渐引入粮食真菌的基因序列分析, 可将分离到的真菌鉴定到属和种水平^[7,10]。目前主要采用内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS 区)作为通用条形码对储藏真菌进行初步鉴

定, 可将分离株鉴定至属或属内复合群水平。但 ITS 序列在 Genbank 数据库中比对分析获得的菌种鉴定信息具有一定的局限性^[11-12], 尤其是曲霉属 *Aspergillus* (粮食储藏真菌优势属), ITS 序列分析过于保守, 不能将所有的物种准确鉴定到单一物种^[12], 因此, 需聚合酶 II 第二大亚基基因(RNA polymerase II, RPB2)、 β -微管蛋白基因(β -tubulin, TUB)或钙调蛋白基因(Calmodulin, CAM)等多个蛋白编码基因对复合群内菌株进行准确种水平鉴定^[13]。本文选择将形态学观察与多基因系统发育分析相结合, 对我国 13 省粮库储藏期间稻谷上优势真菌进行准确鉴定, 为粮食上危害真菌的识别和鉴定提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验样品

本研究稻谷样品分别来源于黑龙江、吉林、辽宁、宁夏、北京、安徽、湖北、湖南、江西、四川、重庆、福建、广西 13 个省储存 1 年的粮仓(高大平房仓)。每仓采样方法为 5 点 3 层法, 共计 15 个样品, 5 个取样点平面位置定为粮仓的东南角、东北角、西南角、西北角以及中央点, 3 层的纵向位置分别为: 上层(距离粮堆表层 0.5 m 左右)、中层(粮堆正中间, 通常距粮堆表层 2.5~3 m 左右, 根据粮仓内粮堆高度而定)和下层(距离粮仓地面 0.5 m 左右), 取样后, 将样品放置于无菌采样袋中, 于 4 °C 条件下保存, 实验前将上层、中层、下层样品分别进行混合。

1.2 主要试剂和仪器

高盐察氏琼脂培养基 (Salt Czapek Dox Agar, SCA)、察氏琼脂培养基 (Capek agar, CA)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato Dextrose Agar, PDA)、麦芽汁琼脂培养基 (Malt Extract Agar, MEA): 北京陆桥技术股份有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB): 宝泰克生物科技有限公司; 2×PCR Master Mix、DL2000 DNA Marker: 天根生化科技 (北京) 有限公司; 引物: 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 科研级生物显微镜 (Axio scopeA1): 德国 zeiss 公司; PCR 仪 (Tgradient): Biometra 公司; 凝胶成像分析仪 (Gel-Doc2000): Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 稻谷上真菌的分离计数和纯化

储藏稻谷真菌的分离主要采用稀释平板法 (SCA 培养基)。称取 25 g 稻谷样品至装有 225 mL 无菌水的锥形瓶中, 振荡 30 min, 充分洗涤后, 制备 10 倍梯度的真菌孢子稀释液, 选择 2 个适宜的稀释梯度进行接种, 每份样品三个平行。接种后及时将 15~30 mL 冷却至 50 °C 左右加了氯霉素的 SCA 培养基倒入已加稀释液的无菌培养皿中。待琼脂凝固后, 置于 28 °C 恒温培养箱中培养 5~8 d。记录稀释倍数和相应真菌菌落数。计数后挑取单菌落边缘菌丝转接 3~4 次, 纯化获得单一菌株。

1.3.2 真菌形态特征鉴定

菌落表观形态观察, 选择 MEA 培养基、CA 培养基或 PDA 培养基用于菌株培养, 在 25 °C 培养箱中培养 7 d 进行观察。微观形态特征观察使用科研级生物显微镜。详细方法参考 Chen 等的实验方法^[14]。

1.3.3 真菌分子生物学鉴定

使用改良的 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 法提取基因组 DNA。用于 ITS 区及 TUB 基因序列的扩增和测序。菌落数较多的分离株及与其形态近似的菌株扩增 CAM 基因和 RPB2 基因并测序。ITS 区的引物选择 ITS4 和 ITS1; TUB 基因

扩增选择引物 bT2a 和 bT2b; RPB2 基因扩增选择引物 RPB2-5F 和 RPB2-7R; CAM 基因扩增选择引物 CMD5 和 CMD6。PCR 反应体系为 25 μL: 引物各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 2×PCR Master Mix 为 12.5 μL, ddH₂O 为 9 μL。反应条件参考 Chen 等的研究方法^[14]。

1.4 数据分析

所有数据采用 EXCEL 软件进行统计分析。ITS、TUB、CAM 以及 RPB2 单基因的序列先分别用软件 MEGA 7 进行聚类, 并两端切齐。切齐后的单基因序列用软件 Mesquite v 3.1 串联为多基因序列组合。采用 RAXML 软件构建最大似然法 (Maximum likelihood) 系统发育树, 系统发育树的每个分支的统计学显著性分析以自展 (Bootstrap) 进行检验, 重复次数为 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 储藏稻谷真菌分离及初步鉴定

本研究对 13 个省储藏 1 年的稻谷进行了真菌分离培养和菌落计数, 共获得真菌 397 株。首先采用 ITS 片段对所获得的真菌分离株进行初步鉴定 (通过 BLASTn 在 NCBI 数据库上对其进行注释), 将分离株初步鉴定至属水平或属内复合群水平。后续补充了 TUB 基因序列, 通过 ITS 和 TUB 基因序列的比对分析结合形态观察结果, 将获得的菌株初步鉴定至种水平。397 个菌株分别属于 2 门 4 纲 5 目 7 科 9 属 49 种 (图 1)。

2.2 储藏稻谷可培养真菌群落结构组成

根据分离株初步鉴定结果分析不同真菌物种在样品中的分布情况如图 1 所示, 曲霉属 *Aspergillus* 丰度最高, 为 22 种, 青霉属 *Penicillium* 次之, 为 10 种。曲霉属 *Aspergillus* 和青霉属 *Penicillium* 数量共占物种总数的 65%, 且曲霉属 *Aspergillus* 的相对丰度远高于其它属。表明稻谷储藏期间的真菌主要为曲霉属 *Aspergillus*。本研究中, 将所有样品中相对丰度大于 40% 且出现 3 次以上的真菌物种定为优势种, 其中多育曲霉 *A. proliferans*、蒙地曲霉 *A. montevicensis*、黄曲霉

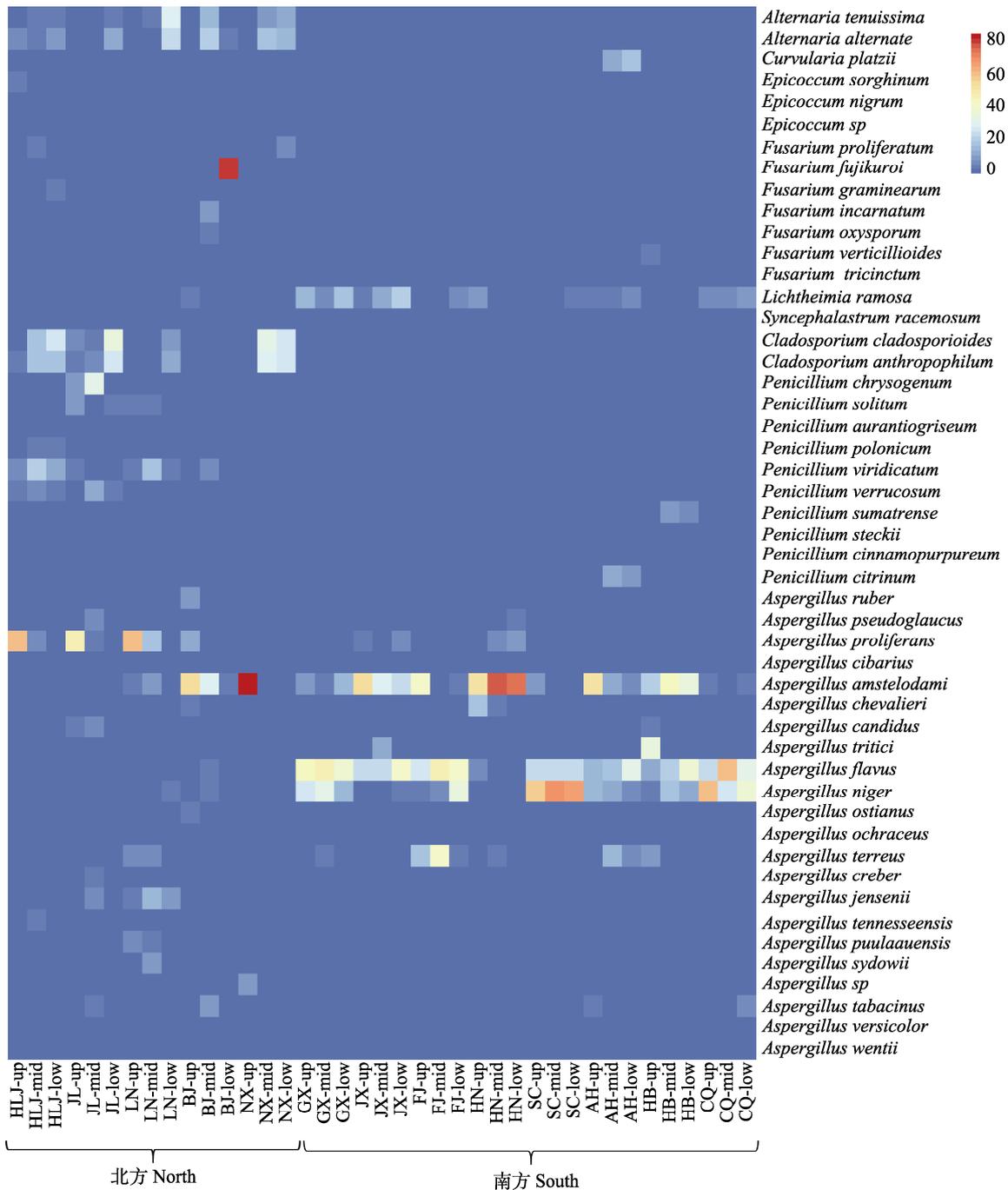


图 1 我国粮仓储藏稻谷不同粮层真菌群落组成

Fig. 1 The fungal community composition of stored rice grains from different grain layers in warehouses of China

注：图中以蓝色和红色表示真菌物种在样品中相对丰度的最低值和最高值；HLJ-黑龙江、JL-吉林、LN-辽宁、BJ-北京、NX-宁夏、GX-广西、JX-江西、FJ-福建、HN-湖南、SC-四川、AH-安徽、HB-湖北、CQ-重庆；up-粮堆上层，mid-粮堆中层，low-粮堆下层。

Note: The blue and red indicate the lowest and highest values of the relative abundance of fungal species in the sample; HLJ-Heilongjiang, JL-Jilin, LN-Liaoning, BJ-Beijing, NX-Ningxia, GX-Guangxi, JX-Jiangxi, FJ-Fujian, HN-Hunan, SC-Sichuan, AH-Anhui, HB-Hubei, CQ-Chongqing; up-upper layer, mid-middle layer, low-lower layer.

A. flavus 和黑曲霉 *A. niger* 是我国储藏稻谷的优势菌。南北方地区的优势菌明显不同，北方以耐旱真菌多育曲霉 *A. proliferans* 和蒙地曲霉 *A. montevidensis* 为主，主要分布在粮堆上层。南方

以蒙地曲霉 *A. montevidensis*、黄曲霉 *A. flavus* 和黑曲霉 *A. niger* 为主，主要分布在粮堆各层。菌落计数统计结果表明，与编号 S49、S46、S36 及 S17 分离株近似的菌落数量最多。其中 S49、S50、

N6、N12、P54 分离株疑似为蒙地曲霉 *A. montevidensis*; S46、S47、S52 分离株疑似为多育曲霉 *A. proliferans*; P1、P2、P3、S36 分离株疑似为黑曲霉 *A. niger*; S17、B63、B64、B65、

B66、B67、B68、B70、F22 分离株疑似为黄曲霉 *A. flavus*。

2.3 储藏稻谷上优势真菌形态鉴定

如图 2 所示, 分离株 S49、S50、N6、N12、

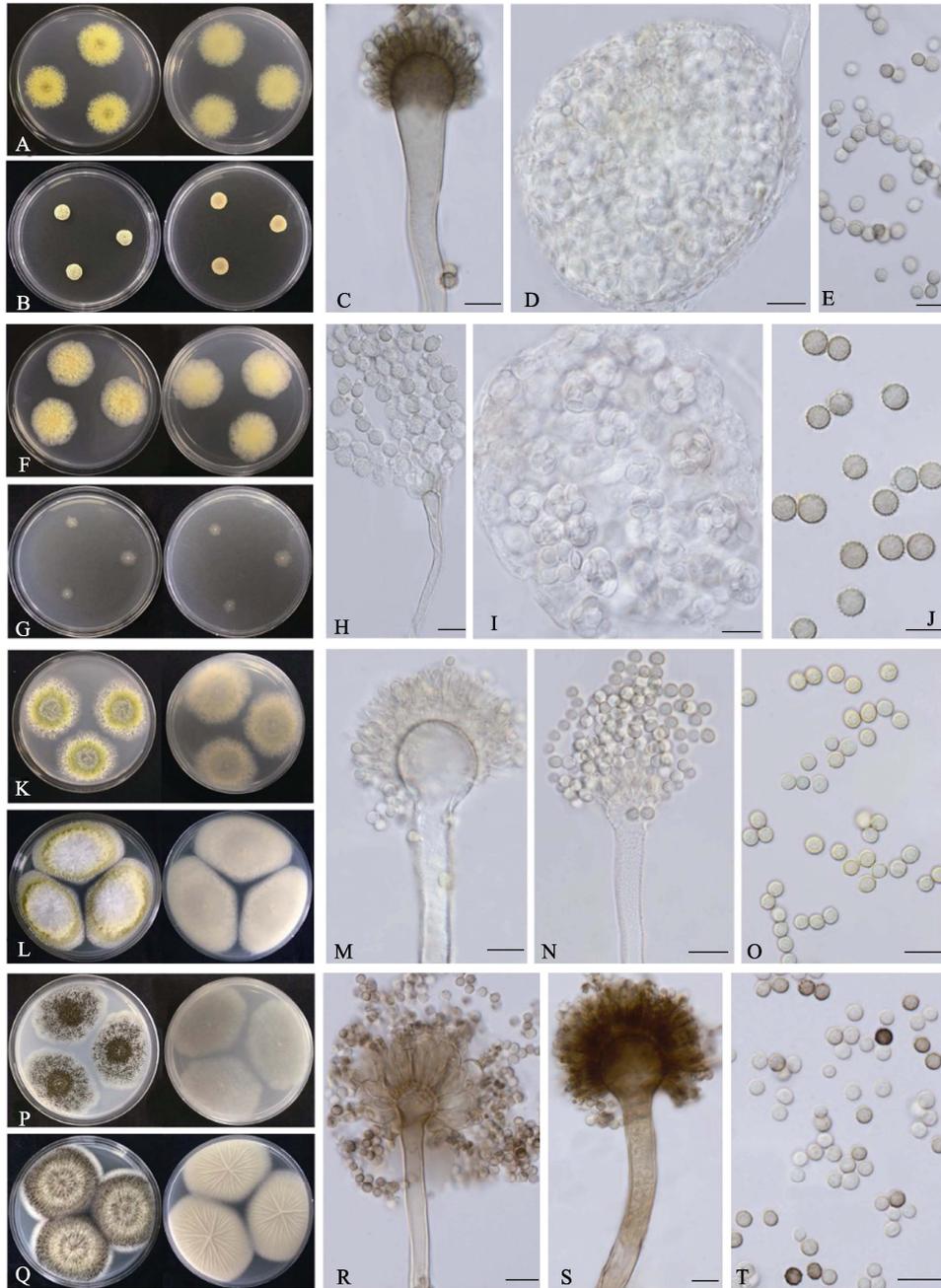


图 2 优势真菌的形态结构

Fig.2 Morphological structure of dominant fungal species

注: A-E: 蒙地曲霉, A (SCA, 正, 反), B (MEA, 正, 反), 7d; C-E (分生孢子梗, 分生孢子头, 闭囊壳, 子囊孢子, 分生孢子); F-J 多育曲霉: F (SCA, 正, 反), G (20%CA, 正, 反), 7d; H-J (分生孢子梗, 分生孢子头, 闭囊壳, 子囊孢子, 分生孢子); K-O: 黄曲霉: K (PDA, 正, 反), L (MEA, 正, 反), 7d; M-O (分生孢子梗, 分生孢子头, 分生孢子); P-T: 黑曲霉, P (PDA, 正, 反), T (MEA, 正, 反), 7d; R-T (分生孢子梗, 分生孢子头, 分生孢子); 标尺=10 μm。

Note: A-E: *A. montevidensis*, A (SCA, Upper, Lower), B (MEA, Upper, Lower), 7d; C-E (Conidiophore, Conidial head, Cleistothecia, Ascospore, Conidia); *A. proliferans*: F (SCA, Upper, Lower), G (20%CA, Upper, Lower), 7d; H-J (Conidiophore, Conidial head, Cleistothecia, Ascospore, Conidia); K-O: *A. flavus*, K (PDA, Upper, Lower), L (MEA, Upper, Lower), 7d; M-O (Conidiophore, Conidial head, Conidia); K-O: *A. niger*, K (PDA, Upper, Lower), L (MEA, Upper, Lower), 7d; M-O (Conidiophore, Conidial head, Conidia); Scales=10 μm.

P54 初步鉴定为蒙地曲霉 *A. montevicensis*, 在 SCA 培养基上菌落生长较为迅速, 正面为橄榄绿色, 呈颗粒状, 反面为墨绿色, 在 MEA 培养基上菌落生长缓慢, 中央呈淡黄色, 边缘为深绿色, 反面为淡黄色。闭囊壳通常为黄色球形或近球形, 直径为 75~220 μm 。分生孢子头为辐射状或疏松柱状, 产孢结构单层, 瓶梗为 (5~12) \times (2.5~3.5) μm , 分生孢子球形、卵形或洋梨形, 大小约为 (4~6.5) \times (3~5) μm , 较大, 表面粗糙, 具小刺。分离株 46、S47、S52 初步鉴定为多育曲霉 *A. proliferans*, 在 SCA 培养基上菌落质地为絮状, 较厚, 正反面颜色均为橄榄黄色, 在 MEA 培养基上不生长, 在 20%蔗糖 CA 培养基生长较为局限, 形成较小的灰白色菌落, 闭囊壳球形或近球形。孢梗茎壁光滑, 分生孢子头直径达 70~150 μm , 为辐射状。顶囊为近球形, 产孢结构单层, 瓶梗 (9~14) \times (3.5~5) μm 。分生孢子呈球形或近球形, 大小约为 (6~10) \times (4~7) μm , 壁粗糙, 具小刺。分离株 S17、B63、B64、B65、B66、B67、B68、B70 和 F22 初步鉴定为黄曲霉 *A. flavus*, 在 CA 培养基上生长迅速, 菌落颜色为黄绿色或草绿色, 反面为无色至淡褐色。在 MEA 培养基上菌落质地丝绒状至絮状, 较厚, 黄绿色, 菌落反面无色。孢梗茎壁厚, 无色, 粗糙具小刺。顶囊为近球形至烧瓶形, 直径为 9~65 μm 。产孢结构通常为双层, 梗基 (6.0~19) \times (3~6) μm , 瓶梗 (6~12) \times (2.5~4) μm 。分生孢子多为球形或近球形, 直径 2.5~6.5 μm , 壁粗糙具小刺。菌核初期白色, 老后呈褐黑色, 球形或近球形。P1、P2、P3、S36 初步鉴定为黑曲霉 *A. niger*, 在 CA 培养基上生长迅速, 菌落表面呈暗褐黑色至炭黑色, 菌落平坦或中心稍凸起, 质地为致密丝绒状, 菌落反面无色至淡黄色。有的菌株会产生菌核。在 MEA 培养基上, 菌落呈褐黑色至炭黑色, 有规则或不规则的辐射状沟纹, 质地丝绒状, 比在 CA 培养基上产生的菌丝更多, 菌落反面为无色至淡黄色。孢梗茎壁光滑。分生孢子头初期为球形, 老后分裂成几个圆柱状结构。顶囊球形或近球形, 直径为 30~80 μm 。产孢结构双层, 瓶梗为 (7~12) \times (2~3) μm , 梗基为 (10~70) \times (3~14) μm , 分

生孢子球形或近球形, 直径 3~5.5 μm , 壁粗糙有小刺, 偶有近于光滑的孢子。

2.4 储藏稻谷上优势真菌分子生物学鉴定

经过 ITS 比对分析和形态特征鉴定, 发现储藏稻谷上的优势菌主要属于 3 个类群, 第一类属于曲霉属 *Aspergillus* 中耐旱真菌类群 (早期属于 *Eurotium* 散囊菌属), 具有嗜高渗透压的特性 (耐旱性); 第二类属于黄色组 *Aspergillus* section *Flavi*; 第三类属于黑色组 *Aspergillus* section *Nigri*。对同一组内的真菌物种而言, ITS 序列在鉴定过程中高度保守, 与其物种的形态特征相近, 区分困难, 容易混淆。因此, 选择真菌的 ITS、TUB、CAM 和 RPB2 基因进行测序, 结合同类群内近似物种的模式菌株和国际权威菌株序列进行多基因系统发育分析, 最终确定真菌的鉴定结果。

2.4.1 储藏稻谷中耐旱真菌类群的多基因系统发育分析

基于四个基因片段的多位点系统发育分析方法, 推测曲霉属 *Aspergillus* 中耐旱真菌物种之间的关系 (图 3)。最终得到的比对数据集包含 21 个分离菌株和 28 个标准菌株 (附表 1), 包括 2 283 个碱基 (ITS 为 500, TUB 为 411, CAM 为 429 和 RPB2 为 943, 包括比对间隙), 菌株 *Penicillium chrysogenum* CBS 30648 作为外群。结果表明, 分离株 N13、N21、N24、P47、P48、P51、P52、P55、P56 和 S55 所测序列与谢瓦曲霉 *A. chevalieri* 标准序列位于系统发育树一个分支上; S49、S50、N6、N12、P54 所测序列与蒙地曲霉 *A. montevicensis* 标准序列位于系统发育树一个分支上; S46、S47、S52 所测序列与多育曲霉 *A. proliferans* 标准序列位于系统发育树一个分支上。最终确定储藏稻谷中属于耐旱真菌的优势种为蒙地曲霉 *A. montevicensis*、谢瓦曲霉 *A. chevalieri* 和多育曲霉 *A. proliferans*。本研究相关分离株的基因序列已经提交至 NCBI 数据库, 登录号见附表 1。

2.4.2 储藏稻谷上黄曲霉复合群内物种的多基因系统发育分析

基于四个基因片段的多位点系统发育分析方法, 推测稻谷上黄曲霉复合群 *Aspergillus* section

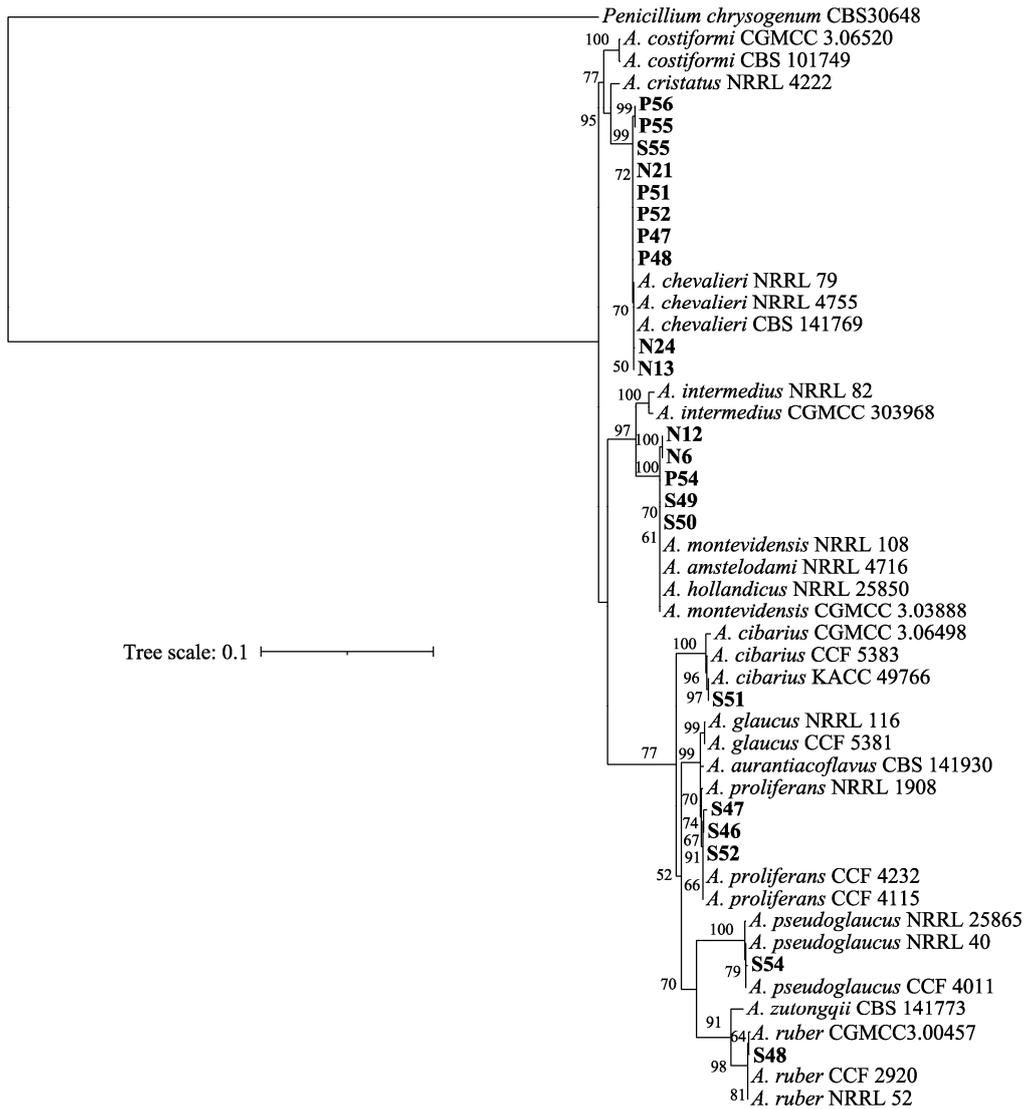


图 3 基于多基因序列 (ITS、TUB、CAM、RPB2) 构建的曲霉属中的部分曲霉 (耐旱真菌) 物种的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of *Aspergillus* section *Aspergillus* (Xerophilic fungi) inferred from combined ITS, TUB, CAM and RPB2

注: 分支上的数字表示自展支持率, 只显示自展支持率大于 50% 的值。

Note: Numbers above branches are bootstrap values. Only values above 50% are showed.

Flavi 内物种之间的关系 (图 4)。最终得到的比对数据集包含 9 个分离菌株和 21 个标准菌株 (附表 2), 包括 2 429 个碱基 (ITS 为 542, TUB 为 509, CAM 为 460 和 RPB2 为 918, 包括比对间隙), 菌株 *P. chrysogenum* CBS 30648 作为外群。S17、B63、B64、B65、B66、B67、B68、B70 和 F22 所测序列与黄曲霉 *A. flavus* 和米曲霉 *A. oryzae* 标准序列位于系统发育树一个分支上 (图 4)。表明上述分离株可能为黄曲霉 *A. flavus* 或米曲霉 *A. oryzae*。通过这 4 个基因片段的多基因系统发育分析无法将黄曲霉 *A. flavus* 和米曲霉 *A. oryzae* 进行区分。结合 2.1 中优势菌的形态学鉴定的结果, 可将分离株准确鉴定为黄曲霉 *A. flavus*。本研究

分离株的基因序列已经提交至 NCBI 数据库, 登录号见附表 2。

2.4.3 储藏稻谷上黑曲霉复合群内物种的多基因系统发育分析

基于四个基因片段的多位点系统发育分析方法, 推测稻谷上黑曲霉复合群 *Aspergillus* section *Nigri* 内物种之间的关系 (图 5)。最终得到的比对数据集包含 4 个分离菌株和 14 个标准菌株 (附表 3), 包括 2 002 个碱基 (ITS 为 448, TUB 为 414, CAM 为 450 和 RPB2 为 690, 包括比对间隙), 菌株 *P. chrysogenum* CBS 30648 作为外群。实验室分离菌株 P1、P2、P3、S36 所测序列与黑曲霉 *A. niger* 标准序列位于系统发育树一个分支上。

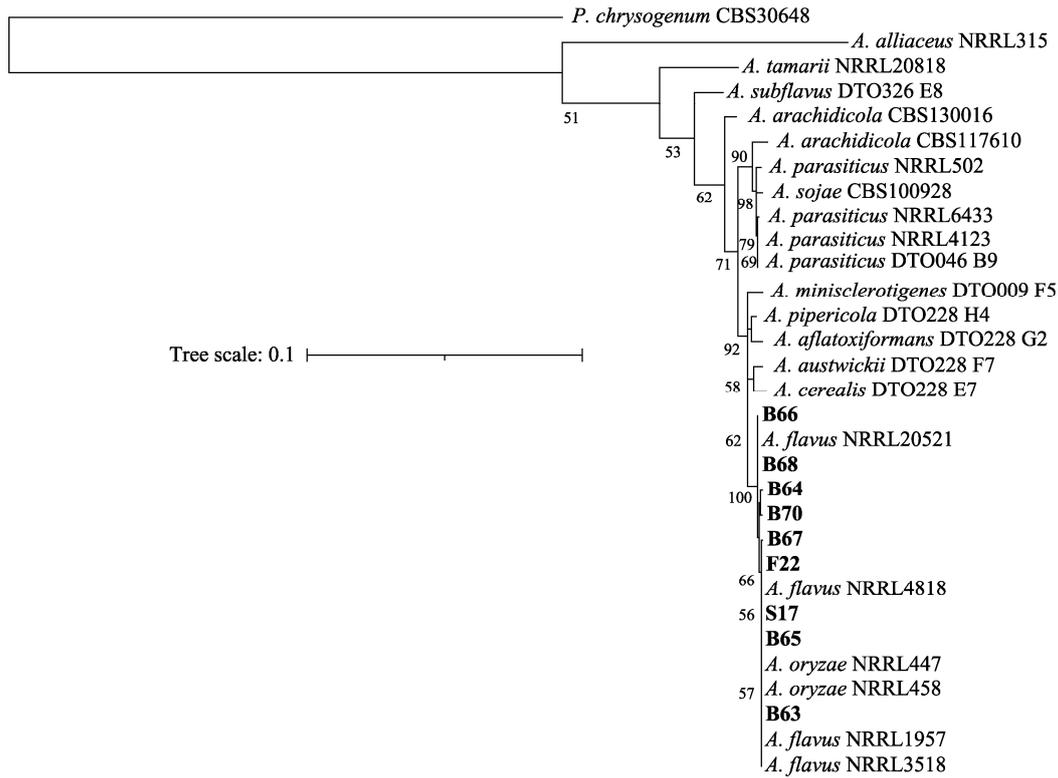


图 4 基于多基因序列 (ITS、TUB、CAM、RPB2) 构建的黄曲霉复合群物种的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of *Aspergillus* section *Flavi* inferred from combined ITS, TUB, CAM and RPB2

注: 分支上的数字表示自展支持率, 只显示自展支持率大于 50% 的值。

Note: Numbers above branches are bootstrap values. Only values above 50% are showed.

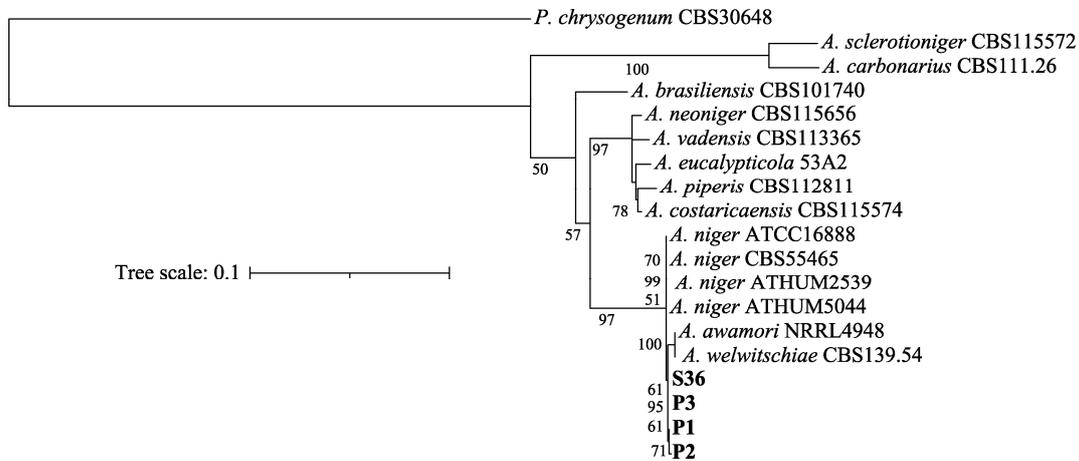


图 5 基于多基因序列 (ITS、TUB、CAM、RPB2) 构建的黑曲霉复合群物种的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of *Aspergillus* section *Nigri* inferred from combined ITS, TUB, CAM and RPB2

注: 分支上的数字表示自展支持率, 只显示自展支持率大于 50% 的值。

Note: Numbers above branches are bootstrap values. Only values above 50% are showed.

最终确定上述分离株均为黑曲霉 *A. niger*。本研究分离株的基因序列已经提交至 NCBI 数据库, 登录号见附表 3。

3 讨论和结论

本研究对我国 13 个省份储藏期稻谷进行了真菌分离、菌落计数和鉴定, 最终获得 397 株菌,

其中 21 个分离株代表储藏期稻谷上优势种, 经形态学观察和多基因系统发育分析, 将 21 个分离株准确鉴定为 4 个种, 分别为黄曲霉 *A. flavus*、黑曲霉 *A. niger*、蒙地曲霉 *A. montevidensis* 和多育曲霉 *A. proliferans*。这与已报道的储藏期粮食上常见的优势真菌种物略有差异^[15-16]。其中黄曲霉 *A. flavus* 和黑曲霉 *A. niger* 在我国南方储藏稻谷

中普遍存在^[7,17], 当优势种为黄曲霉 *A. flavus* 和黑曲霉 *A. niger* 时, 黄曲霉毒素和赭曲霉毒素污染的风险可能增加^[18], 这两种真菌是粮食行业需重点关注的危害真菌。很多研究中提到 *A. glaucus* 灰绿曲霉是储粮上常见的优势菌^[11], 我们分离的优势菌蒙地曲霉 *A. montevidensis* 原命名为阿姆斯特丹曲霉 *A. amstelodami*, 经 Chen 等^[14] 系统研究后, 更名为蒙地曲霉 *A. montevidensis*, 属 Raper 等(1965)分类系统中灰绿曲霉群 *A. glaucus* group 中典型代表, 经真菌命名溯源, 与前人研究是一致的。而多育曲霉 *A. proliferans* 属于早期研究中提到的局限曲霉群 *A. restrictus* group, 也是储粮上常见真菌物种之一^[14]。这些物种具有嗜高渗透压的特性(耐旱性), 能够在水分活度(a_w)低于0.75条件下生长^[19], 通常生长缓慢, 若不采取防控措施, 长期生长仍会对稻谷品质造成影响, 如导致发芽率降低, 脂肪酸值升高, 出现色泽变暗, 气味异常等情况, 因此作为粮堆霉变发热早期监测预警主要指示菌群^[20]。

粮食中真菌种、属的鉴定, 由于技术条件和研究方法不同, 且真菌形态具有多样性, 使得粮食真菌精准鉴定方面还存在一些不足, 如粮食上耐旱真菌的鉴定结果和种名一直存在争议, 黄曲霉 *A. flavus* 和米曲霉 *A. oryzae* 很难准确区分, 不利于后期研究学者进行深入研究。本研究采用形态学观察及 ITS、TUB、CAM 和 RPB2 多基因系统发育分析相结合的方法, 对储藏稻谷上曲霉属 *Aspergillus* 的3个主要优势类群进行了深入研究, 并给出了主要优势种的精准鉴定方法, 可为粮食中基因型或表型相似真菌物种的准确鉴定提供参考。

参考文献:

- [1] 张瑛, 吴先山, 吴敬德, 等. 稻谷储藏过程中理化特性变化的研究[J]. 中国粮油学报, 2003, 18 (6): 20-24.
ZHANG Y, WU X S, WU J D, et al. The effects of natural fermentation on characteristics of the rice starch granule[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2003, 18 (6): 20-24.
- [2] GONCALVES A, GKRILLAS A, DORNE J L, et al. Pre- and postharvest strategies to minimize mycotoxin contamination in the rice food chain[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(2): 441-454.
- [3] 张海洋, 欧阳毅, 祁智慧, 等. 稻谷储存水分和温度对真菌生长和稻谷主要品质的影响[J]. 粮油食品科技, 2017, 25 (2): 39-43.
ZHANG H Y, OUYANG Y, QI Z H, et al. Influence of storage moisture content and temperature on green of fungi and quality of stored paddy[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2017, 25 (2): 39-43.
- [4] ZHAO Y, WANG Q, HUANG J, et al. Mycotoxin contamination and presence of mycobiota in rice sold for human consumption in China[J]. Food Control, 2019, 98: 19-23.
- [5] REDDY O R, SATHYANARAYANA N. Seed-borne fungi of rice and quarantine significance[M]. Springer Netherlands, 2001.
- [6] ZULKIFLI N A, ZAKARIA L. Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed [J]. Journal of Biosciences, 2017, 24 (1): 26-34.
- [7] 葛志文, 方宝庆, 邱伟芬, 等. 储藏稻谷优势霉菌的分离鉴定及特征分析[J]. 粮油食品科技, 2019, 27 (3): 72-77.
GE Z W, FANG B Q, QIU W F, et al. Separation, identification and characteristics analysis of dominant mould in stored rice [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2019, 27 (3): 72-77.
- [8] YAZDANI D, ZAINAL ABIDIN M A, TAN Y H, et al. Molecular identification of *Aspergillus* and *Eurotium* species isolated from rice and their toxin-producing ability[J]. Microbiology, 2011, 80 (5): 720-727.
- [9] 吴红萍, 翟世博, 杜晨辉, 等. 海南省储粮稻谷的霉菌多样性分析[J]. 贵州农业科学, 2015, 43 (4): 138-141.
WU H P, ZHAI S B, DU C H, et al. Analysis of mold diversity of grain storage paddy in Hainan Province[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2015, 43 (4): 138-141.
- [10] 都立辉, 和肖营, 刘凌平, 等. 淮稻5号的真菌多样性及其储藏过程中可培养的优势真菌[J]. 中国农业科学, 2016, 49 (7): 1371-1381.
DU L H, HE X Y, LIU L P, et al. Fungal diversity of Huaidao No. 5 rice and the dominant culturable fungal strains during storage[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49 (7): 1371-1381.
- [11] 李娜, 周红丽, 张兵, 等. 稻谷霉菌的分离鉴定及其对稻谷品质的影响研究[J]. 中国粮油学报, 2020, 35 (12): 115-124.
LI N, ZHOU H L, ZHANG B, et al. Isolation and identification of rice mold and its effect on rice quality[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35 (12): 115-124.
- [12] SAMSON R A, VISAGIE C M, HOUBRAKEN J, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*[J]. Studies in mycology, 2014, 78 (78): 141-173.
- [13] FRISVAD J C, HUBKA V, EZEKIEL C N, et al. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins[J]. Studies in Mycology, 2019, 93: 1-63.

- [14] CHEN A J, HUBKA V, FRISVAD J C, et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly Eurotium), and its occurrence in indoor environments and food[J]. *Studies in Mycology*, 2017, 88: 37-135.
- [15] KUMARI R, JAYACHANDRAN L E, GHOSH A K. Investigation of diversity and dominance of fungal biota in stored wheat grains from governmental warehouses in West Bengal, India[J]. *J Sci Food Agric*, 2019, 99 (7): 3490-3500.
- [16] OH J Y, SANG M K, OH J E, et al. Microbial population, aflatoxin contamination and predominant *Aspergillus* species in Korean stored rice[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2010, 26 (2): 121-129.
- [17] 祁智慧, 周欣, 张海洋, 等. 中国稻谷可培养真菌群落组成及多样性[J]. *菌物学报*, 2020, 39 (4): 683-694.
 QI Z H, ZHOU X, ZHANG H Y, et al. Community composition and diversity of culturable fungi from the rice grains in China[J]. *Mycosystema*, 2020, 39 (4): 683-694.
- [18] BARANYI N, MUTHUSAMY C, VAGVOLGYI C, et al. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update[J]. *Acta Biologica Szegediensis*, 2015, 59 (2): 151-167.
- [19] FLEURAT-LESSARD F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins – An update[J]. *Journal of Stored Products Research*, 2017, 71: 22-40.
- [20] GRECO M, KEMPPAINEN M, POSE G, et al. Taxonomic characterization and secondary metabolite profiling of *Aspergillus* Section *Aspergillus* contaminating feeds and feedstuffs[J]. *Toxins*, 2015, 7 (9): 3512-3537. 
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。

附表1 本实验分离菌株及标准分离株在 GenBank 登录号
 Attached table 1 Standard isolates used in this study and their GenBank accession numbers

Species	Strain	ITS	TUB	CaM	RPB2
<i>A. chevalieri</i>	NRRL 79	EF652069	EF651912	EF652003	EF651955
	NRRL 4755	EF652071	EF651913	EF652004	EF651956
	CBS 141769	LT670927	LT671023	LT671024	LT671025
<i>A. cibarius</i>	KACC 49766	LT670930	LT671032	LT671033	LT671034
	CGMCC 3.06498	LT670934	LT671046	LT671047	LT671048
	CCF 5383	LT670932	LT671040	LT671041	LT671042
<i>A. aurantiacoflavus</i>	CBS 141930	LT670917	LT670993	LT670994	LT670995
<i>A. costiformi</i>	CBS 101749	HE615136	HE801338	HE801320	HE801309
	CGMCC 3.06520	LT670937	LT671055	LT671056	LT671057
<i>A. cristatus</i>	NRRL 4222	NR135341	EF651914	EF652001	EF651957
<i>A. glaucus</i>	NRRL 116	NR135337	EF651887	EF651989	EF651934
	CCF 5381	LT670942	LT671070	LT671071	LT671072
<i>A. intermedius</i>	NRRL 82	NR137448	EF651892	EF652012	EF651958
	CGMCC 3.03968	LT670946	LT671082	LT671083	LT671084
<i>A. montevicensis</i>	NRRL 108	NR137449	EF651898	EF652020	EF651964
<i>A. amstelodami</i>	NRRL 4716	EF652079	EF651899	EF652018	EF651965
<i>A. hollandicus</i>	NRRL 25850	EF652082	EF651900	EF652021	EF651966
<i>A. montevicensis</i>	CGMCC 3.03888	LT670954	LT671106	LT671107	LT671108
<i>A. proliferans</i>	NRRL 1908	NR135339	EF651891	EF651988	EF651941
	CCF 4115	FR851850	FR851855	HE578090	HE578107
	CCF 4232	HE615129	HE801329	HE801317	HE801306
<i>A. pseudoglaucus</i>	NRRL 40	NR135336	EF651917	EF652007	EF651952
	NRRL 25865	EF652065	EF651918	EF652008	EF651953
	CCF 4011	FR839678	FR775358	FR751446	HE578111
<i>A. ruber</i>	NRRL 52	NR131286	EF651920	EF652009	EF651947
	CCF 2920	FR727112	FR775357	FR751444	HE974430
	CGMCC 3.00457	LT670980	LT671187	LT671188	LT671189
<i>A. zutongqii</i>	CBS 141773	LT670986	LT671206	LT671207	LT671208
<i>A. proliferans</i>	S46	MZ573087	MZ826400	MZ826366	MZ826434

续附表 1

Species	Strain	ITS	TUB	CaM	RPB2
	S47	MZ573088	MZ826401	MZ826367	MZ826435
	S52	MZ573093	MZ826406	MZ826372	MZ826440
<i>A. ruber</i>	S48	MZ573089	MZ826402	MZ826368	MZ826436
<i>A. montevicensis</i>	S49	MZ573090	MZ826403	MZ826369	MZ826437
	S50	MZ573091	MZ826404	MZ826370	MZ826438
	N6	MZ573096	MZ826409	MZ826375	MZ826443
	N12	MZ573097	MZ826410	MZ826376	MZ826444
	P54	MZ573105	MZ826418	MZ826384	MZ826452
<i>A. cibarius</i>	S51	MZ573092	MZ826405	MZ826371	MZ826439
<i>A. pseudoglaucus</i>	S54	MZ573094	MZ826407	MZ826373	MZ826441
<i>A. chevalieri</i>	S55	MZ573095	MZ826408	MZ826374	MZ826442
	N13	MZ573098	MZ826411	MZ826377	MZ826445
	N21	MZ573099	MZ826412	MZ826378	MZ826446
	N24	MZ573100	MZ826413	MZ826379	MZ826447
	P47	MZ573101	MZ826414	MZ826380	MZ826448
	P48	MZ573102	MZ826415	MZ826381	MZ826449
	P51	MZ573103	MZ826416	MZ826382	MZ826450
	P52	MZ573104	MZ826417	MZ826383	MZ826451
	P55	MZ573106	MZ826419	MZ826385	MZ826453
	P56	MZ573107	MZ826420	MZ826386	MZ826454

附表 2 本实验分离菌株及标准分离株在 GenBank 登录号
Attached table 2 Standard isolates used in this study and their GenBank accession numbers

Species	Strain	ITS	TUB	CaM	RPB2
<i>A. aflatoxiformans</i>	DTO 228-G2	NR171606	MG517706	MG518076	MG517897
<i>A. alliaceus</i>	DTO 046-B1=NRRL 315	NR121331	EF661465	EF661534	MG517825
<i>A. flavus</i>	NRRL 1957	AF027863	EF661485	EF661508	EF661440
	NRRL 4818=DTO 046-B7	EF661563	MG517643	MG518014	MG517828
	NRRL 20521	EF661547	EF661492	EF661514	EF661447
	NRRL 3518	EF661552	EF661487	EF661510	EF661442
<i>A. oryzae</i>	NRRL 447	NR135395	EF661483	EF661506	EF661438
	NRRL 458	EF661562	EF661484	EF661507	EF661439
<i>A. parasiticus</i>	NRRL 502	NR121219	EF661481	EF661516	EF661449
	DTO 046-B9	MG662404	MG517644	MG518030	MG517829
	NRRL 4123	EF661555	EF661479	EF661518	EF661451
	NRRL 6433	EF661568	EF661480	EF661519	EF661452
<i>A. minisclerotigenes</i>	DTO 009-F5	MG662408	MT024508	MG518007	MG517797
<i>A. pipericola</i>	DTO 228-H4	MG662385	MG517717	MG518087	MG517908
<i>A. austwickii</i>	DTO 228-F7	NR171607	MG517702	MG518072	MG517893
<i>A. cerealis</i>	DTO 228-E7	MG662394	MG517693	MG518063	MG517884
<i>A. sojae</i>	CBS 100928 = DTO 046-C3	NR111545	EF203168	EF202041	MG517831
<i>A. arachidicola</i>	CBS 117610 = DTO 009-G3	MF668184	EF203158	EF202049	MG517802
<i>A. mottae</i>	CBS 130016 = DTO 223-C8	NR137519	MG517687	MG518058	MG517878
<i>A. subflavus</i>	DTO 326-E8	MH279429	MG517773	MG518143	MG517964
<i>A. tamarii</i>	NRRL20818	AF004929	EF661474	EF661526	EU021629
<i>A. flavus</i>	S17	MZ618695	MZ826425	MZ826391	MZ826459
	B63	MZ618696	MZ826426	MZ826392	MZ826460

续附表 2

Species	Strain	ITS	TUB	CaM	RPB2
	B64	MZ618697	MZ826427	MZ826393	MZ826461
	B65	MZ618698	MZ826428	MZ826394	MZ826462
	B66	MZ618699	MZ826429	MZ826395	MZ826463
	B67	MZ618700	MZ826430	MZ826396	MZ826464
	B68	MZ618701	MZ826431	MZ826397	MZ826465
	B70	MZ618702	MZ826432	MZ826398	MZ826466
	F22	MZ618703	MZ826433	MZ826399	MZ826467

附表 3 本实验分离菌株及标准分离株在 GenBank 登录号

Attached table 3 Standard isolates used in this study and their GenBank accession numbers

Species	Strain	ITS	TUB	CaM	RPB2
<i>A. neoniger</i>	CBS 115656	FJ491682	FJ491691	FJ491700	—
<i>A. niger</i>	ATCC 16888	NR111348	KU897009	—	—
	ITEM 4501 = CBS 554.65	AY585554	AY585536	AJ964872	—
	ATHUM 5044	EU982008	EU982067	—	EU982093
	ATHUM 2539	EU982009	EU982068	—	EU982092
<i>A. costaricensis</i>	CBS 115574	NR103604	AY820014	EU163268	—
<i>A. awamori</i>	CBS 557.65=NRRL 4948	KF288139	KF288129	KF288119	—
<i>A. vadensis</i>	CBS 113365	MH862923	GU296695	FN594560	—
<i>A. eucalypticola</i>	CBS 122712=53A2	EU482439	EU482435	EU482433	MN969070
<i>A. piperis</i>	CBS 112811	NR077191	AY820013	FN594554	—
<i>A. welwitschiae</i>	CBS 139.54	NR137513	MN969369	LC570775	MN969100
<i>A. brasiliensis</i>	CBS 101740	AJ280010	AY820006	AM295175	—
<i>A. carbonarius</i>	CBS 111.26	DQ900605	AY585532	AJ964873	—
<i>A. sclerotioniger</i>	CBS 115572	DQ900606	AY819996	EU163271	—
<i>A. niger</i>	P1	MZ618691	MZ826421	MZ826387	MZ826455
	P2	MZ618692	MZ826422	MZ826388	MZ826456
	P3	MZ618693	MZ826423	MZ826389	MZ826457
	S36	MZ618694	MZ826424	MZ826390	MZ826458