

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2024.01.018

李欣蔚, 李佳, 林琳, 等. 房式仓储对进口大豆真菌群落多样性的影响[J]. 粮油食品科技, 2024, 32(1): 139-145.

LI X W, LI J, LIN L, et al. Effects of house warehouse storage on fungal community diversity of imported soybean[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2024, 32(1): 139-145.

房式仓储对进口大豆真菌群落多样性的影响

李欣蔚, 李 佳, 林 琳, 陈怡岑, 曹 毅, 赵 旭

(辽宁省农科院粮食科学研究所, 辽宁 沈阳 110032)

摘要: 为探究房式仓储对进口高油大豆真菌群落多样性的影响, 以当年收获的高油大豆为实验材料在房式仓中过夏储藏 3 个月后, 定期取样测定水分, 并利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析原始状态和其他储藏阶段大豆中真菌群落状态。结果表明, 不同储藏时期的大豆样品中的真菌群落共属于 4 个门, 9 个纲, 14 个目, 15 个科, 21 个属, 19 个种。大豆在不同储藏时期的 4 个优势菌门为子囊菌门 (*Ascomycota*)、担子菌门 (*Basidiomycota*)、羊肚菌门 (*Mortierellomyco*)、毛霉菌门 (*Mucoromycota*)。在种的水平上进行分类统计分析发现, 相对丰度较高的 10 个菌种在数量上均呈现随着储藏时间的延长而有不同程度增加的趋势 (C47>B47>A47), 并发现了 1 种有害真菌赤霉菌。通过 Ven 图分析和 Beta 多样性分析发现, 在房式仓中储藏的前两个储藏期的大豆样品中真菌群落结构具有较高的相似性, 而到了第三储藏期与前两者真菌群落结构差异较大, 说明到了第三储藏期大豆中的真菌群落不仅多样性显著增加, 结构也发生了明显演替。

关键词: 进口大豆; 高通量测序; 真菌群落结构; 安全储藏

中图分类号: TS201.3; S-3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2024)01-0139-07

Effects of House Warehouse Storage on Fungal Community Diversity of Imported Soybean

LI Xin-wei, LI Jia, LIN Lin, CHEN Yi-cen, CAO Yi, ZHAO Xu
(Liao Ning Grain Science Research Institute, Shenyang, Liaoning 110032, China)

Abstract: In order to explore the effects of house warehouse storage on fungal community diversity of imported soybean, Illumina MiSeq high-throughput sequencing was employed to analyze the fungal community structure and diversity of newly harvested imported high oil soybean for 3 months with periodic sampling for moisture determination. The result demonstrated that the fungal communities in different storage periods in the high oil soybean belonged to 4 phyla, 9 classes, 14 orders, 15 families, 21 genera and 19 species in accordance with the 97% sequence similarity level. The four dominant phyla of soybean in different storage periods were *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomyco* and *Mucoromycota*. At the

收稿日期: 2023-07-17

基金项目: 辽宁省科学计划项目面上项目 (2023010714-JH3/107)

Supported by: Science Plan Project-Surface Project of Liaoning Province (No. 2023010714-JH3/107)

作者简介: 李欣蔚, 女, 1987 年出生, 博士, 高级工程师, 研究方向为粮食储藏过程中真菌群落及真菌毒素调控。E-mail: xinweili.love@163.com

species level, classification statistical analysis showed that the 10 strains with relatively high abundance presented an increasing trend with the extension of storage time (C47>B47>A47). In addition, quarantine pathogenic fungus *Gibberella* were found. Through the analysis of Ven map and Beta diversity, it was found that the fungal community structure of soybean samples in the first two storage periods was relatively similar. The fungal community structure of soybean samples in the third storage period was significantly different from that in the first two storage periods with the storage of house warehouse. It could be concluded that the fungal community diversity of soybean samples in the third storage period not only increased significantly, but also experienced obvious succession of fungal community structure.

Key words: imported soybean; high-throughput sequencing; fungal community structure; storage safety

大豆是我国重要的粮食、油料和经济作物。截止 2020 年,我国大豆总产量约在 1 960 万 t,而进口转基因高油大豆约占我国大豆总产量的 83%^[1]。高油大豆是根据 GB1352—2009《大豆》中粗脂肪干基料含量在 20%以上的大豆,主要用途是榨油。这是由于近年来我国国民膳食结构发生了变化,其中对食用油和肉类的消费量持续增加^[2]。因此进口大豆的储备数量大幅上升,我国大豆储备规模随之日趋增大^[3-4]。

通常大豆的储藏时间长短和温度具有高度的关联性,而温度是引起霉菌生长的直接原因^[5]。

“房式仓”为我国仿造建造的机械化房式仓,多为砖木结构,但设计低矮通风条件差,极易发生不安全储粮因素^[6]。“房式仓”由于其自身仓型特点,会使得粮堆部分点位存在高温高湿的不安全储粮因素。同时大豆由于其自身籽粒结构特点以及所富含的蛋白质和脂肪,极易吸湿发热造成霉变,进而导致浸油赤变、发芽力丧失等不良现象。目前大部分的研究^[7-10]都以普通大豆为对象,而对高油大豆在储藏过程中的真菌群落变化鲜有报道。高通量测序技术可以直接对样本 DNA 进行提取测序,从而得到样品中全面的病原微生物信息,且能检测到表达丰度较低的基因,降低漏检率。

因此本研究采用高通量测序技术对房式仓中高油大豆储藏期间真菌群落进行动态监测,从而针对储藏期间真菌变化规律建立一套科学的储藏体系,为保证大豆的安全储藏和品质控制提供有力措施。实验选用进口阿根廷高油大豆,采用房式仓对夏季入仓的进口大豆进行常规储藏,通过

对粮情、大豆水分及其真菌多样性的动态监测探究粮情发生危险时的真菌群落特征和变化规律。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验采用中储粮某直属库 2022 年进口阿根廷高油大豆,按照表 1 中条件各取粮堆中混合样品 150 g,称取 50 g 于无菌均质袋中作为 3 个平行样品,命名为“样品名_a、b、c”于实验室中 4 ℃保存;采用粮情监测系统 ASDL-128 型和测温电缆传感器型号 18B20 对取样条件进行监测。

表 1 取样条件及样品命名
Table 1 Sampling conditions and sample naming

| 取样时间 | 2022-06-17 | 2022-08-10 | 2022-09-15 |
|--------|------------|------------|------------|
| 储藏温度/℃ | 24.2 | 30.7 | 27.2 |
| 样品命名 | A47 | B47 | C47 |

1.2 仪器与设备

电子天平 TX223L:日本岛津公司;恒温恒湿箱 HWS-300:宁波东南仪器有限公司;粮情监测系统 ASDL-128 型:赤峰今辰电子有限公司;测温电缆传感器型号 18B20:辽宁省宽甸市桐源电缆厂;TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit: Illumina 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 水分含量的测定

水分含量按照 GB/T 20264—2006《粮食、油料水分两次烘干测定法》测定。

1.3.2 微生物宏基因组 ITS 1 区测序

采用 Illumina 平台对群落 DNA 片段进行双端

(Paired-end) 测序, 利用 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备测序文库^[11], 测序原始数据以 FASTQ 格式保存。

1.4 数据处理

采用 DADA2 和 Vsearch 两种方法进行序列去噪、聚类, 使用 R 语言脚本, 对全部样本中所包含的高质量序列的长度分布进行统计。选用 UNITE 数据库 (Release 8.0, <https://unite.ut.ee/>)^[12] 对样本真菌 ITS 序列进行物种注释。使用 “qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree” 的分析流程, 调用 mafft^[13] 进行多序列对齐, 并 mask 无系统发育信息的部分, 再调用 FastTree 构建了系统发育树, 生成无根树文件; 最后以中心点基础构建有根树文件。

2 结果与分析

2.1 房式仓中高油大豆水分含量的变化

水分是粮食内部各种生理生化反应的媒介物, 其含量的多少决定了粮食储藏过程中品质的变化速率以及储藏稳定性^[14]。如图 1, 进口高油大豆的水分含量随着储藏时间的延长而略有升高, 由入仓水分 9.5% 升高至 9.85%。由于房式仓的仓型特点和夏季入仓的气候特点, 仓储企业在入仓前将大豆水分控制在 10% 以下以降低粮情风险。当大豆吸湿而水分升高时, 籽粒呼吸释放出的一部分水汽被大豆吸收^[15], 释放出来的热能则聚集在豆堆内不易散发出来, 有可能导致大豆热损^[16-17]。

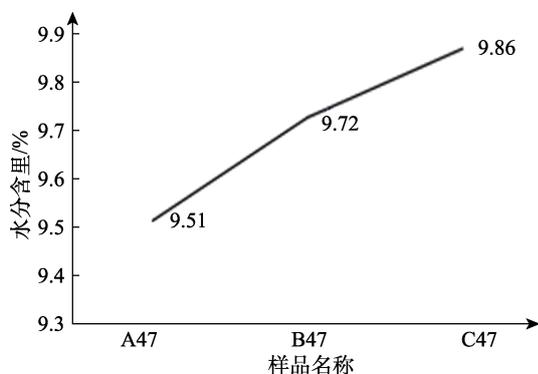


图 1 大豆水分含量变化

Fig.1 The changes of moisture in soybeans

2.2 高油大豆中真菌的分类学注释分析

物种的注释过程, 其本质是与参考序列数据

库进行比对, 以及对比结果进行打分判定的过程。由图 2 中可知, 不同储藏时期的大豆样品真菌群落共计属于 4 个门, 9 个纲, 14 个目 15 个科, 21 个属, 19 个种。随着储藏的进行, 在各个分类水平下的 OTU 数目逐渐增加, 真菌数量在逐渐增加。

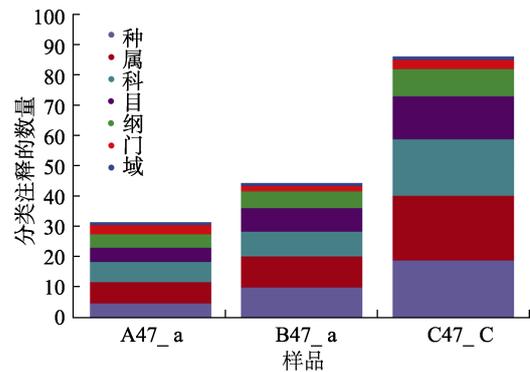


图 2 大豆的分类学注释结果统计图

Fig.2 Statistical chart of high oil soybean in annotation taxonomy

2.3 大豆中真菌群落多样性指数性分析

为了能够较为全面的评估样品中真菌菌群的 Alpha 多样性, 本实验以 Chao1 和 Observed species 指数表征样品真菌菌群丰富度, 以 Shannon 和 Simpson 指数表征多样性, 以 Pielou's evenness 指数表征均匀度, 以 Good's coverage 指数表征覆盖度。Chao1, Simpson 指数, Observed species 指数在三份样品中均呈逐渐上升趋势, 说明随着储藏的进行, 大豆的真菌群落多样性逐渐升高。Pielou's evenness 指数在 C47 样品中显著高于 A47, 47 样品, 说明随着储藏时间的延长, 真菌菌群均匀度和多样性显著升高, 大豆样品的真菌群落从种类到数量开始大量繁殖 (图 3)。

2.4 大豆中真菌在不同分类水平下的组成差异分析

如图 4, 大豆在不同储藏时期的真菌群落在门的水平上分类为 4 个菌门, 分别为子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、羊肚菌门 (Mortierellomycota)、毛霉菌门 (Mucoromycota)。其中毛霉菌门大多为腐生菌, 这种菌因能立即用大多数简单的碳水化合物, 将比较复杂的物质留

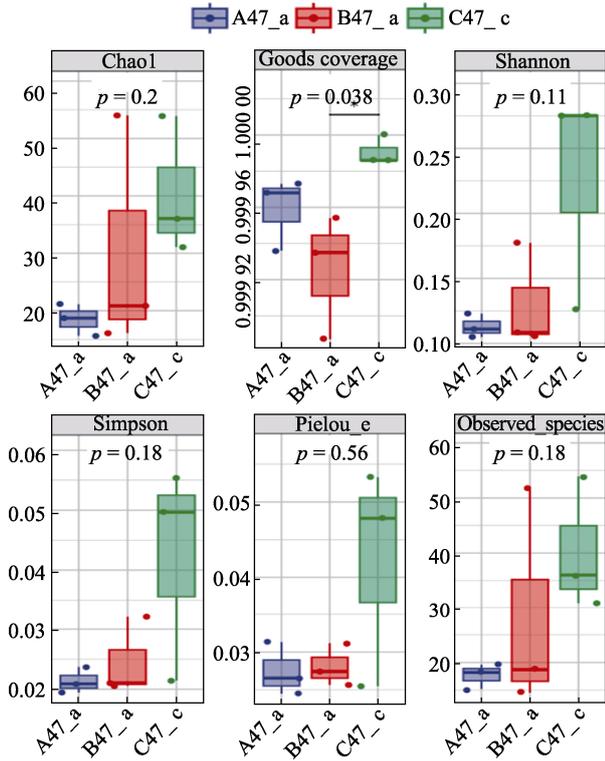


图 3 多样性指数箱线图

Fig.3 The diversity index box plots of samples

给其他微生物去利用，所以有“糖菌”之称。子囊菌门 (*Ascomycota*)、担子菌门 (*Basidiomycota*) 随着储藏时间的延长其数量呈现增加趋势直至成为优势菌门，而羊肚菌门 (*Mortierellomycota*) 在 B47 样品中数量降低为 0，毛霉菌门 (*Mucoromycota*) 在 C47 样品中数量降低为 0。

房式仓中储藏的转基因高油大豆在不同储藏

时期的真菌群落在种的水平上进行分类统计，如图 7，选取相对丰度较高的 10 个物种绘制成表，相对丰度是指为该分组方案各样本中对应物种的相对丰度，如表 2。10 个菌种在数量上均呈现随着储藏时间的延长而有不同程度的增加趋势 (C47>B47>A47)。其中 *Saitozyma_podzolica* 为一种新型的非常规产油酵母，可以利用多种碳源 (醋酸盐或木质纤维素) 生成单细胞油 (Single cell oil, SCO)，SCO 被认为是生物柴油和油脂化学品的可持续来源^[18]。该种新型菌株在大豆储藏过程中利用分子生物学技术首次被监测到。*Mycosphaerella_tassiana* 为大麦叶烧病菌，属于我国检疫性病原真菌。此前胡佳续等^[19]在对美国进口大豆的病原真菌。检测中通过分离培养的方式对该种病原菌进行了分离。真菌群落中的第二优势菌种为 *Aspergillus_ruber* 赤曲霉，赤霉菌属，为进口农产品中常见有害真菌。

2.5 转基因高油大豆真菌的物种组成及丰度热图

热图是使用 R 脚本计算各样本以及各分类单元的聚类结果，展示各个样本的物种丰度分布趋势，一般采用平均丰度前 20 位的进行绘制，如图 5。在房式仓中储藏的转基因高油大豆中，随着储藏时间的延长，只有 *Thermomyces* 嗜热真菌在数量上呈现先增加后降低的趋势，其它 19 个菌属的数量均随着储藏时间的延长而减少。

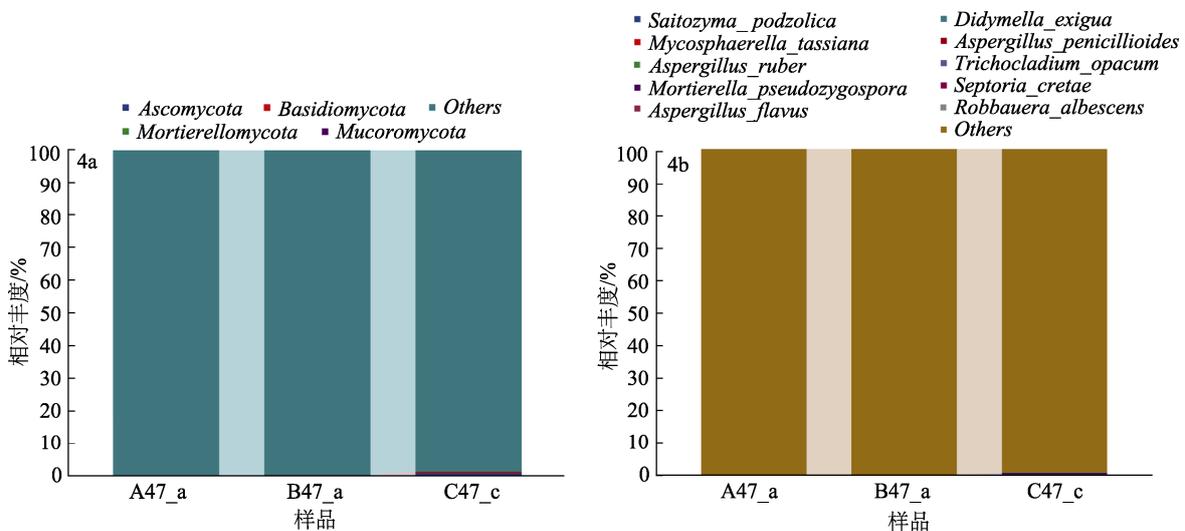


图 4 在门 (4a)、种 (4b) 的水平下的组成差异

Fig.4 Composition differences at the level of the phylum (6a) and genus (6b)

表 2 各优势菌种在样品中所占丰度

Table 2 Abundances of dominant species among samples

| 菌种名称 | A47 | B47 | C47 |
|---------------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| <i>Saitozyma_podzolica</i> | 0 | 0 | 0.002 084 88 |
| <i>Mycosphaerella_tassiana</i> | 0 | 0.000 003 9 | 0.000 951 79 |
| <i>Aspergillus_ruber</i> | 0.000 004 5 | 0.000 008 6 | 0.000 423 02 |
| <i>Didymella_exigua</i> | 0 | 0.000 117 41 | 0.000 362 59 |
| <i>Aspergillus_penicillioides</i> | 0 | 0 | 0.000 453 23 |
| <i>Septoria_cretae</i> | 0 | 0 | 0.000 317 26 |
| <i>Robbauera_albescens</i> | 0 | 0 | 0.000 271 94 |
| <i>Papiliotrema_aurea</i> | 0 | 0 | 0.000 241 72 |
| <i>Trichosporon_dohaense</i> | 0 | 0 | 0.000 211 51 |
| <i>Plectosphaerella_oratosquillae</i> | 0 | 0 | 0.000 196 4 |

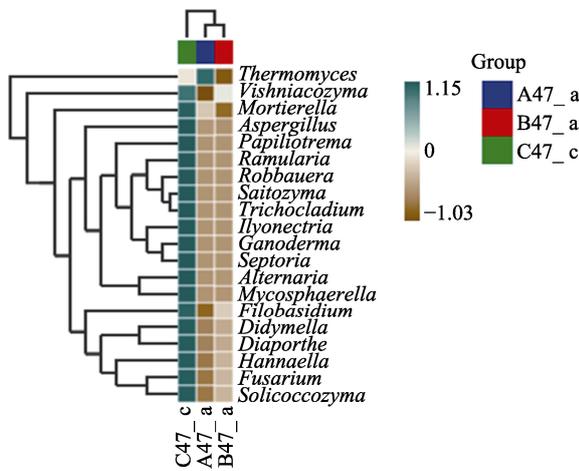


图 5 大豆中真菌物种组成热图

Fig.5 The heatmap of the fungi communities in high oil soybean

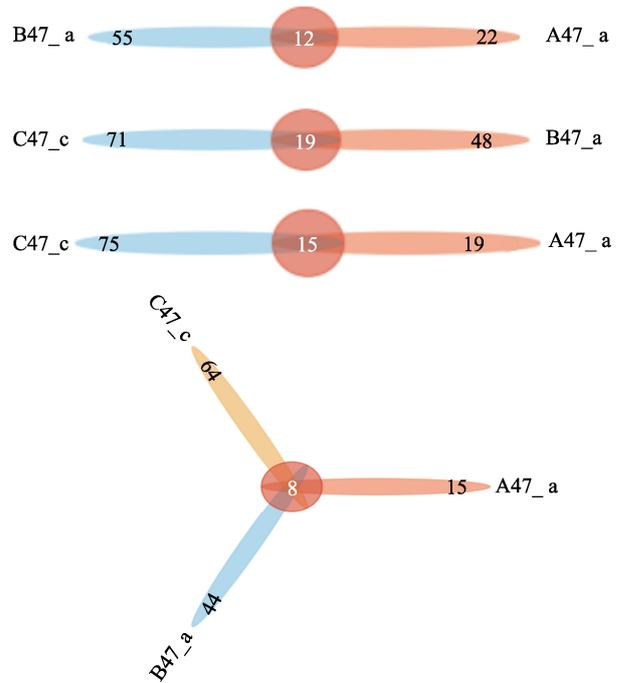
2.6 不同储藏时期大豆真菌群落差异分析

通过 Ven 图进行群落分析,如图 6,对房式仓中三个储藏时期的样品进行两两比对发现,三个时期共有的 OTU 数目最多的两组分别是第二和第三储藏期(B47、C47),共有的 OTU 数量为 19 个。而对三个储藏期的样品进行共同比对发现,三者共有的 OTU 数量仅为 8 个。而三者特有的 OTU 数量有所增长, C47 特有的 OTU 数量为 64 个。这说明随着储藏时间的延长,房式仓中的转基因大豆中真菌的菌群丰富度和多样性在增加。

2.7 Beta 多样性分析

依据 Ramette^[20]的方法对房式仓中储藏的进口高油大豆进行 PCA 分析(Principal Component Analysis)。如图 7,图中的点分别代表了不同储藏时期大豆中的真菌群落结构,各个点距离越近

表示群落结构的相似度越高。可以看出, A47 构具有较高的相似度,而到了第三储藏期 C47 与前两者真菌群落结构差异较大,说明到了第三储藏期大豆中的真菌群落不仅多样性显著增加,真菌群落结构也发生了明显演替。



注:不同样本分组用不同的颜色表示,不同颜色圆圈重叠的区域标注数字表示共有的 OTU 数。

Note: Different sample groups are represented by different colors, and the area with overlapping circles of different colors indicates the number of OTU in common.

图 6 不同储藏期大豆物种差异性比较 Ven 图

Fig.6 The Ven Plot of the samples

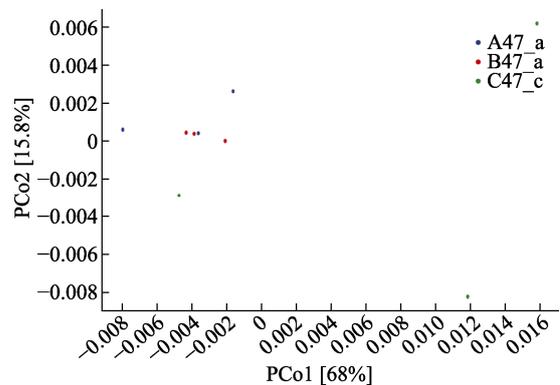


图 7 不同储藏时期的大豆中真菌的主成分分析图

Fig.7 Principal component analysis of mould in soybean among different storage periods

3 结论

影响大豆储存品质的因素主要有储存水分、

温度和微生物, 这些因素之间相互关联、相互作用, 构成一个复杂的大豆储存生态体系, 共同影响大豆储藏质量变化, 理清这些因素之间的关系, 一直是大豆储藏安全方面研究的一个难点。而“房式仓”由于其特殊建筑结构会使得储藏粮堆存在风险点。因此本研究通过监测夏季入“房式仓”的进口转基因高油大豆的品质变化及真菌群落结构变化, 来探究储藏方式对转基因大豆的储藏质量的影响。

通过跟踪储藏期 6 月至 9 月的大豆样品水分含量发现进口高油大豆的水分含量由入仓水分 9.5% 升高至 9.85%。水分变化不明显的原因在于降低了大豆入仓前的水分, 对于大豆而言, 当其含水量超过临界水分时, 呼吸增强所产生的水分及热量将会严重威胁其储藏安全^[30]。利用 Illumina 平台对 9 份大豆样品的 DNA 片段进行双端测序, 对 OTU 进行物种分类后发现, 不同储藏时期的大豆样品中的真菌群落共计属于 4 个门, 9 个纲, 14 个目, 15 个科, 21 个属, 19 个种。随着储藏时间的延长, 大豆的真菌菌群均匀度和多样性呈现显著升高的趋势。大豆在不同储藏时期的 4 个优势菌门为子囊菌门 (*Ascomycota*)、担子菌门 (*Basidiomycota*)、羊肚菌门 (*Mortierellomycota*)、毛霉菌门 (*Mucoromycota*)。在种的水平上进行分类统计分析发现相对丰度较高的 10 个菌种在数量上均呈现随着储藏时间的延长而有不同程度的增加趋势 (C47>B47>A47), 并发现 1 种有害真菌赤霉菌。通过 Ven 图分析和 Beta 多样性分析发现, 在房式仓中储藏的前两个储藏期的大豆样品中真菌群落结构具有较高的相似度, 而到了第三储藏期与前两者真菌群落结构差异较大, 说明到了第三储藏期大豆中的真菌群落不仅多样性显著增加, 真菌群落结构也发生了明显演替。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业农村部“十四五”全国种植业发展规划 (农农发[2021]11 号) [R]. 2021-12-29.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China "14th Five-Year" National planting Industry Development Plan (Nongnong Fa [2021] No. 11) [R]. 2021-12-29.
- [2] 周伟男, 马帅. 我国大豆用农药和市场发展浅析[J]. 世界农药, 2022, 44(4): 7-15.
ZHOU W N, MA S. Analysis of soybean pesticides and market development in China [J]. World Pesticides, 2022, 44(4): 7-15.
- [3] 李建雅. 黑龙江大豆和美国大豆在山东储藏期间品质变化研究[J]. 粮食储藏, 2019(4): 46-51.
LI J Y. Study on quality change of Heilongjiang soybean and American soybean during storage in Shandong Province[J]. Food Storage, 2019(4): 46-51.
- [4] 江党生, 陈基彬, 莫代亮, 等. 南方地区高大平房仓进口大豆安全储藏技术研究[J]. 粮食储藏, 2019(6): 11-15.
JIANG D S, CHEN J B, MO D L, et al. Study on safe storage technology of imported soybeans in tall cottage warehouse in Southern China[J]. Food Storage, 2019(6): 11-15.
- [5] 王倩. 房式仓进口大豆与国产大豆的储存特性的比较[D]. 河南工业大学, 2015.
WANG Q. Comparison of storage characteristics of imported soybean and domestic soybean in house warehouse[D]. Henan University of Technology, 2015.
- [6] 邵同永, 陈文平. “苏式”仓存储中央储备粮研究[J]. 物流与供应链, 2017(6): 100-104.
SHAO T Y, CHEN W P. Research on central grain reserve storage in "Soviet-style" warehouse[J]. Logistics and Supply Chain, 2017(6): 100-104.
- [7] 金文. 充氮气调大豆的储藏及加工品质研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2011.
JIN W. Study on storage and processing quality of nitrogenous controlled soybean[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2011.
- [8] 龙伶俐, 薛雅琳, 郁伟, 等. 大豆储藏品质判定指标的研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(7): 82-85.
LONG L L, XUE Y L, YU W, et al. Study on storage quality evaluation index of soybean[J]. Journal of Cereals and Oils, 2012, 27(7): 82-85.
- [9] 刘锦. 充氮储藏对大豆品质的影响[D]. 南京: 南京财经大学, 2013.
LIU J. Effect of nitrogen storage on soybean quality[D]. Nanjing: Nanjing University of Finance and Economics, 2013.
- [10] 李燕羽, 曹阳, 黄成, 等. 4 种储藏方式对东北大豆品质影响的研究[J]. 粮油食品科技, 2013, 21(5): 105-108.
LI Y Y, CAO Y, HUANG C, et al. Effect of four storage methods on quality of soybean in Northeast China[J]. Science and Technology of Cereals, Oil and Food, 2013, 21(5): 105-108.
- [11] 李欣蔚. 不同水分稻谷中真菌群落结构及多样性的差异分析[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 57-64, 96.
LI X W. Difference analysis of fungal community structure and diversity in rice with different moisture[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 57-64, 96.
- [12] KOLJALG U, NILSSON R H, ABARENKOV K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi[J]. Molecular Ecology, 2020, 22: 5271-5277.

- [13] KATO H K. Mafft: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(14): 3059-3066.
- [14] 张玉荣, 倪浩然, 吴琼, 等. 基于动力学模型的高油大豆储藏期间品质指标变化规律[J]. *农业工程学报*, 2022, 38(17): 311-320.
ZHANG Y R, NI H R, WU Q, et al. Variation of quality indexes of high-oil soybean during storage based on dynamic model[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2022, 38(17): 311-320.
- [15] 郭孝萱, 李世磊, 邱静, 等. 不同含水量进口大豆储运品质变化研究[J]. *农产品质量与安全*, 2023, 121(1): 94-98.
GUO X X, LI S L, QIU J, et al. Study on storage and transportation quality of imported soybean with different water content[J]. *Quality and Safety of Agricultural Products*, 2023, 121(1): 94-98.
- [16] 金俊, 姜秋水, 刘新. 进口大豆热损贬值的因素分析与评估[J]. *中国油脂*, 2019, 44(9): 133-137.
JIN J, JIANG Q S, LIU X. Factors analysis and evaluation of heat loss and depreciation of imported soybeans[J]. *China Oils and Fats*, 2019, 44 (9): 133-137.
- [17] 吴琼, 李岩, 张来. 浅谈大豆的储藏(一)[J]. *粮食加工*, 2021, 46(3): 65-69.
WU Q, LI Y, ZHANG L. Discussion on soybean storage (I) [J]. *Food Processing*, 2021, 46(3): 65-69.
- [18] 李欣蔚. 基于高通量测序探究东北粳稻储藏期间真菌群落的演替[J]. *现代食品科技*. 2022, 38(7): 98-106.
LI X W. Study on succession of fungal communities during storage of japonica rice in Northeast China based on high-throughput sequencing[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(7): 98-106.
- [19] OLGA G, REBECCA H, IOANNI P, et al. Evaluation of downstream processing, extraction, and quantification strategies for single cell oil produced by the oleaginous yeasts *Saitozyma podzolica* DSM 27192 and *apiotrichum porosum* DSM 27194[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020.
- [20] YURKOV A M, KURTZMAN P. Three new species of Tremellomycetes isolated from maize and northern wild rice[J]. *FEMS Yeast Research*, 2019, 19(2). 

备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。