

杨焕春,李勇,单宏,等.黑龙江省粳稻田间与储藏真菌群落演替规律研究[J].黑龙江农业科学,2020(12):86-92.

黑龙江省粳稻田间与储藏真菌群落演替规律研究

杨焕春¹,李勇¹,单宏²,李莉莉²,兰静²,赵琳²,孙向东²

(1. 安顺学院,贵州 安顺 561000;2. 黑龙江省农业科学院 农产品质量安全研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为促进黑龙江省稻谷合理仓储,保障黑龙江省粳稻品质安全,采用 Illumina Hiseq 高通量测序方法,于 2016 年秋季在黑龙江省五常地区分别采集 3 份新鲜水稻样品,将这些样品仓储 1,2 和 3 a 后进行 ITS 区的高通量测序,分析了物种组成和丰度、Alpha 多样性和菌群结构。结果表明:入库储藏 3 a 后,稻谷样品储藏真菌群落构成演化为子囊菌门(Ascomycota)仍占绝对优势,但比重由 94.4% 下降为 82.1%;散囊菌目(Eurotiales, 25.6%)和煤炱目(Capnodiales, 20.1%)为优势目;曲霉属(*Aspergillus*, 24.7%)和节担菌属(*Walleimia*, 7.4%)为优势属;帚状曲霉(*Aspergillus penicillioides*, 14.3%)为优势种。不同储藏时间的水稻样品真菌物种组成丰富,真菌种群结构存在一定差异。

关键词:粳稻;田间真菌;群落构成;多样性;功能预测

稻谷是我国主要粮食作物,我国约有 65% 的人口以稻米为主食。黑龙江省是我国最大的粳稻生产省份,近年来粳稻产量连续位居全国各省之首。黑龙江省粳稻一直以食味品质优良而享誉全国,尤其以五常市种植的稻花香二号为最优,深受全国人民的喜爱,冠以“五常大米”“五常稻花香”等名称的黑龙江大米远销全国各地,成为畅销品种,历久不衰。

稻谷生长过程中长期处于炎热、潮湿的水田环境,田间真菌种类多、数量大,导致水稻植株带菌量大。如果后期储存不善,极易引起附着在稻谷上的霉菌大量繁殖、甚至产生毒素,从而对人类健康构成较大的威胁。因此,稻谷田间真菌群落构成特性对稻谷收获后加工处理及储藏条件有较大影响,需要根据具体情况采取合理的策略。明确具体产地稻谷田间真菌群落构成及其不同储藏期间真菌群落演替规律,成为采取合理措施、保障稻谷质量的前提条件之一。

高通量测序技术(High-throughput sequencing)具有高通量、高灵敏度、高准确性和低成本等特点,近年来该技术已应用于对不同生态系统

的微生物多样性的研究,如海洋^[1-2]、肠道^[3-4]、土壤^[5-6]、粮食作物^[7]、食品饮料^[8-9]甚至动物表皮^[10]等,实现了对不同生态类型、不同产品的深入、细致的微生物群落结构解析及相关微生物的功能预测。从目前情况看,我国开展的稻谷田间真菌污染方面的研究很少,而关于黑龙江省粳稻田间真菌污染方面鲜有报道。本课题拟采用高通量测序直接揭示黑龙江省水稻主产区五常市新收获水稻,以及其经过 1,2 和 3 a 仓储后的真菌污染情况,鉴别特异性真菌,并进行功能分类和预测,揭示五常地区优质稻米品种稻花香二号从田间真菌到储藏真菌群落演替规律,从而为后续合理仓储提供有效建议,为保障黑龙江粳稻质量安全提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

2016 年 9 月 26-29 日在黑龙江省水稻主产五常地区采集刚入库的新鲜稻花水稻香样品 3 份,编号为 WC-1、WC-2 和 WC-3。每份水稻样品采集稻谷各 2 kg,装入无菌塑料袋中,密封运回实验室。随后在相同仓储库于 2017 年 9 月末、2018 年 9 月末及 2019 年 9 月末连续 3 a 采集不同储藏时间的相同批次稻谷样品各 3 份,每份 2 kg,装入无菌塑料袋中,密封运回实验室。

1.2 方法

1.2.1 样品预处理 每个样品分别称取 3 份,每份 50 g 样品置于 1 000 mL 无菌三角瓶中,加入 500 mL PBS 缓冲液(KH₂PO₄ 0.27 g, Na₂HPO₄

收稿日期:2020-07-24

基金项目:哈尔滨市优秀学科带头人基金资助项目(2013 RFXJ049, 2016RAXYJ085);国家农产品质量安全风险评估重大专项(GJFP2019016);安顺学院博士基金(Asxybsj 201901)。

第一作者:杨焕春(1978-),女,硕士,实验师,从事食品质量安全研究。E-mail:541557434@qq.com。

通信简介:孙向东(1965-),男,博士,研究员,从事农产品质量安全风险评估研究。E-mail:xdsun65@yahoo.com。

1.42 g, NaCl 8 g, KCl 0.2 g 溶于 800 mL 蒸馏水中, 调节 pH 至 7.4, 定容至 1 L, 然后煮沸杀菌, 冷却至室温备用), 无菌塑胶膜封口。实验过程戴无菌口罩和手套。每个水稻样品取 3 次重复处理。将三角瓶置于振荡器上振荡 30 min, 洗脱稻谷上粘附的霉菌。然后吸滤过 0.45 μm 水滤膜, 用医用无菌镊子夹取滤膜放入 1 mL 离心管中, 盖好后直接置于液氮桶中冷冻处理。这些冷冻后的样品在干冰冷冻条件下寄至广州基迪奥生物科技有限公司进行 PCR 扩增后的高通量测序。

1.2.2 DNA 提取及 PCR 扩增 采用 E. Z. N. A. 粪便基因组试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U. S.), 按照厂商操作程序提取真菌 DNA。真核核糖体 RNA 基因的 ITS 区采用 PCR 扩增(95 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$, 27 次循环 10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 最后在 68 $^{\circ}\text{C}$ 扩增 10 min), 使用

引物 ITS3 _ KYO2F 5'-GATGAAGAACGY-AGYRAA-3' 和 ITS4R 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 其中条形码是每个样本唯一的八碱基序列。PCR 反应是在 50 μL 含有 5 μL 10 \times KOD 缓冲液, 5 μL 2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, 1.5 μL 引物(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL KOD 聚合酶, 100 ng 模板 DNA 的混合物中重复 3 次。

1.2.3 Illumina Hiseq 2500 测序 用 2% 琼脂糖凝胶提取扩增子, 采用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒(Axygen Biosciences, Union City, CA, U. S.) 按照厂商提供的程序纯化扩增子并采用 QuantiFluorTM-ST(Promega, U. S.) 定量。纯化的扩增子在 Illumina 平台上按标准程序以等摩尔和配对末端测序中汇集(2 \times 250)。原始测序数据提交 NCBI 序列存档(SRA)数据库。

1.2.4 生物信息分析 按照图 1 流程进行。

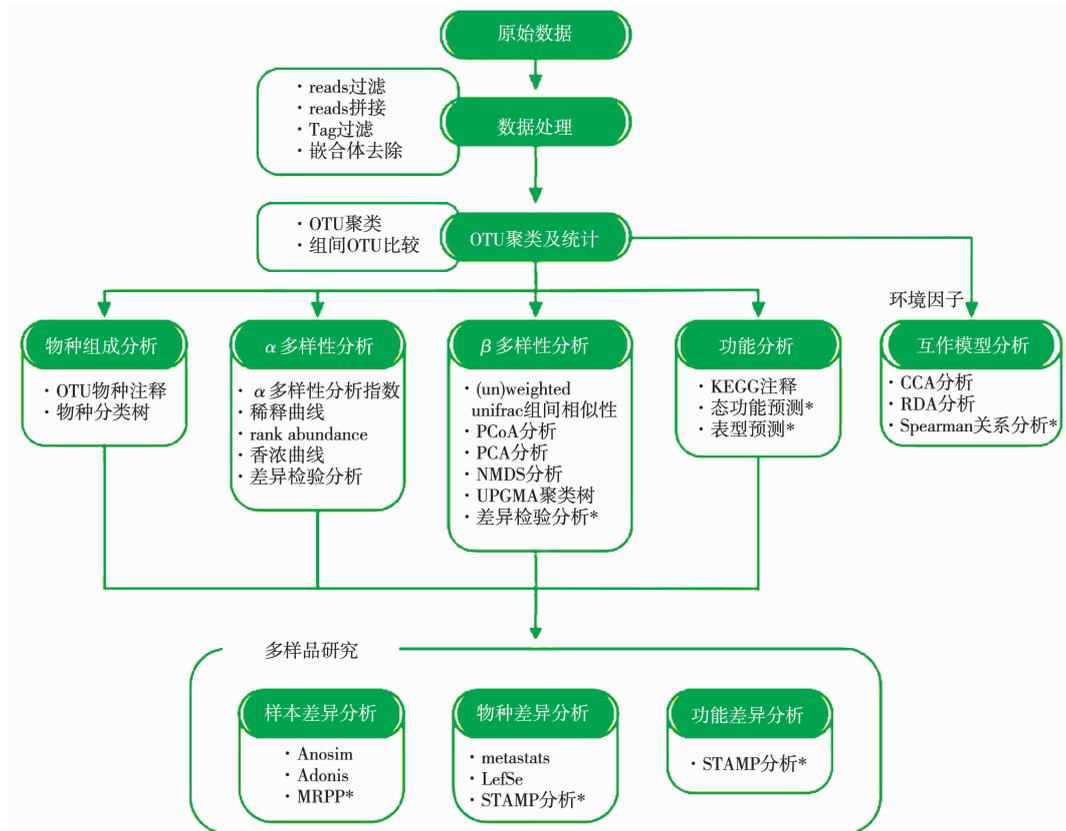


图 1 生物信息分析流程图

Fig. 1 Bio-information analysis flow chart

1.2.5 质量控制和数据拼接 (1)数据过滤。含有的接头和低质量数据会影响后续拼接和分析, 为此, 原始数据需要进一步按照下述原则进行过滤以获得高质量的干净数据:

①去除含有超过 10% 未知核苷酸的数据(N);

②去除含有低于 80% 碱基质量(Q-value) > 20 的数据。

(2)数据拼接。配对终端的干净数据用具有最小重叠 10 bp 和失配错误率 2% 的软件 FL-SAH^[11](v 1. 2. 11)合并为原始标签。

(3)原始标签过滤。原始标签的噪声序列在专门过滤环境下采用 QIIME^[12](V1. 9. 1)途径过滤^[13],以获得高质量的干净标签。

(4)嵌合体检测与去除。在参考数据库内搜索干净标签 (http://drive5.com/uchime/uchime_download.html),采用 UCIME 算法进行基于参考数据的嵌合检验 (http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html),去除所有嵌合标签,最终获得有效标签用于后续分析。

(5)OTU 归类。有效标签采用 UPARSE^[14]途径按照 $\geq 97\%$ 相似度归类为操作分类单元 (OTUs)。选择具有最高丰度的标签序列作为每个簇内的受控序列。组之间进行 Venn 分析以鉴别特殊和普通的 OTU。

(6)分类学分类。代表性序列采用基于 RDP 分类器^[15](Version 2. 2)的朴素贝叶斯模型基于 UNITE^[16]数据库 (<https://unite.ut.ee/>)。各分类和系统发育树的丰度统计在 Perl 脚本中构建并使用 SVG 可视化。各组分别用转移子和 LEfSe 软件筛选生物标志物特征。

(7) α 多样性分析。Chao1, Simpson 以及其他 α 多样性指标采用 QIIME 计算。OTU 稀疏曲线和秩丰度曲线用 QIIME 作图。用 R 值对组间 α 多样性指标进行比较和统计分析,采用 Welch's 的 *t*-检验和 Wilcoxon 的秩检验。用 R 值对组间 α 多样性指数进行比较,并进行 Tukey's 的 HSD

检验和 Kruskal-Wallis 的 H 检验。

(8)功能预测。使用 FUNGuild(v1. 0)^[17]推断 OTUs 的功能群。

2 结果与分析

2.1 水稻真菌 OTU 水平及生物多样性分析

经数据处理,最终测定得到不同时期水稻样本的 OTU 数详见表 1。一般情况下,如果序列之间的相似性大于 98% 就可以把它定义为一个 OTU,每个 OTU 对应于一个不同的序列,也就是每个 OTU 对应于一个不同的真菌种。由此可见,五常地区的水稻样本上真菌种类较多。从不同阶段的 OTU 具体数值看,储藏 2 a 的稻谷真菌种类最多,储藏 1 a 的稻谷真菌种类最少,但是,统计分析显示入库前、储藏 1 a、2 a、3 a 的稻谷真菌种类数量无显著性差异。

五常地区水稻样品在不同储藏阶段的 Alpha 多样性指数,Chao1 指数、Ace 指数、覆盖度、Shannon 指数、Simpson 指数等指标计算结果详见表 1。真菌丰富度方面(用 Chao1 和 Ace 表示),Chao1 和 Ace 结果完全一致,入库前、储藏 1 a、2 a、3 a 的稻谷样本真菌丰富度之间均无显著性差异。真菌多样性方面(用 Shannon 和 Simpson 指数表示),Shannon 和 Simpson 指数均为储藏 3 a 的稻谷数值最大,表明储藏 3 a 的水稻样本真菌多样性最高,这 4 个阶段之间从统计结果看差异并未达到极显著。从覆盖度方面看,样品入库前为 99. 8%,入库后均达到 99. 9%,表明测序几乎覆盖全部真菌物种。

表 1 五常地区稻谷样品不同仓储阶段真菌群落多样性信息

Table 1 Fungal community diversity information of rice samples at different storage stages in Wuchang area

仓储阶段 Storage stages	OTU	Chao 1 指数 Chao 1 index	Ace 指数 Ace index	覆盖度 Coverage/%	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index
入库前	427±104 a	612. 2±130. 2 a	607. 8±130. 0 a	99. 8±0. 0 a	3. 27±0. 55 a	0. 74±0. 07 a
储藏 1 a	398±68 a	472. 1±69. 2 a	480. 9±64. 8 a	99. 9±0. 0 b	4. 41±0. 94 ab	0. 89±0. 06 bc
储藏 2 a	495±83 a	598. 9±52. 8 a	580. 5±96. 8 a	99. 9±0. 0 b	3. 47±0. 35 a	0. 81±0. 03 ab
储藏 3 a	405±47 a	473. 2±45. 0 a	454. 2±41. 4 a	99. 9±0. 0 b	5. 02±0. 39 b	0. 92±0. 02 c

注:同列不同小写字母代表差异显著($P < 0. 05$)。

Note: Different lowercases in the same line indicate significant difference ($P < 0. 05$).

2.2 物种组成分析及演替规律

物种组成分析反映样品在不同分类学水平上的群落结构。由表 2 可知,五常地区水稻真菌在

门目属种水平的群落结构和分类比较的相对丰度结果。

2.2.1 门水平 对于入库前稻谷的田间真菌构

成,相对丰度占绝对优势的菌门为子囊菌门(Ascomycota)占 94.4%,担子菌门(Basidiomycota)相对含量很低,仅占 5.3%(表 2)。储藏 1 a,稻谷真菌门构成为子囊菌门(Ascomycota)占 77.7%,担子菌门(Basidiomycota)相对含量增加,占 19.5%,有花植物门(Anthophyta)占 2.0%。储藏 2 a,稻谷真菌门构成为子囊菌门(Ascomycota)占 93.3%,担子菌门(Basidio-

mycota)相对含量占 6.1%,有花植物门(Anthophyta)占 0.2%。储藏 3 a,稻谷真菌门构成为子囊菌门(Ascomycota)占 82.1%,担子菌门(Basidiomycota)相对含量占 14.2%,有花植物门(Anthophyta)占 2.4%。总体来看,经过粮库储藏,稻谷真菌群落构成增加了有花植物门(Anthophyta),但相对丰度有波动,这可能与储藏条件和取样部位等有较大关系。

表 2 五常地区水稻不同储藏阶段的真菌在门、目、属、种水平的群落结构和相对丰度

Table 2 Community structure and relative abundance of fungi at phylum, order, genus and species level in rice from Wuchang region at different storage stages

储藏阶段 Storage stages	门 Phylum	比例 Proportion/ %	目 Order	比例 Proportion/ %	属 Genus	比例 Proportion/ %	种 Species	比例 Proportion/ %	
入库前	Ascomycota	94.4	Capnodiales	47.2	<i>Cladosporium</i>	45.8	<i>Epicoccum nigrum</i>	9.2	
	Basidiomycota	5.3	Pleosporales	23.9	<i>Alternaria</i>	11.9	<i>Gliocladium cibotii</i>	1.7	
			Hypocreales	14.4	<i>Epicoccum</i>	9.7	<i>Gibberella zeae</i>	1.2	
			Trichosphaeriales	4.8	<i>Gibberella</i>	3.2	<i>Fusarium proliferatum</i>	1.1	
			Tremellales	3.7	<i>Papiliotrema</i>	1.3	<i>Gibberella intricans</i>	1.0	
			Eurotiales	1.1	<i>Fusarium</i>	1.2	<i>Gibberella fujikuroi</i>	0.9	
			<i>Cryptococcus</i>	0.7	<i>Scheffersomyces shehatae</i>	0.6			
	<i>Saitozyma</i>	0.3	<i>Neosulcatispora strelitziae</i>	0.1					
	储藏 1 a	Ascomycota	77.7	Pleosporales	34.4	<i>Alfaria</i>	4.7	<i>Ustilaginoidea virens</i>	3.1
		Basidiomycota	19.5	Capnodiales	17.9	<i>Setophoma</i>	4.5	<i>Pyrenochaetopsis leptospora</i>	2.0
Hypocreales				15.7	<i>Aspergillus</i>	3.9	<i>Brassica carinata</i>	1.3	
Tremellales				6.6	<i>Ustilaginoidea</i>	3.1	<i>Aspergillus penicillioides</i>	1.1	
Eurotiales				4.3	<i>Sarocladium</i>	1.0	<i>Sarocladium strictum</i>	0.9	
Trichosphaeriales				0.8	<i>Alternaria</i>	0.9	<i>Nigrospora oryzae</i>	0.8	
Wallemiales				0.5	<i>Nigrospora</i>	0.8	<i>Wallemia canadensis</i>	0.5	
<i>Wallemia</i>				0.5	<i>Hannaella sinensis</i>	0.1			
Ascomycota		93.3	Eurotiales	56.1	<i>Aspergillus</i>	53.7	<i>Aspergillus penicillioides</i>	22.8	
Basidiomycota		6.1	Capnodiales	19.5	<i>Wallemia</i>	3.8	<i>Wallemia canadensis</i>	3.6	
	Pleosporales		8.2	<i>Alternaria</i>	1.8	<i>Sarocladium strictum</i>	0.9		
	Hypocreales		6.5	<i>Sarocladium</i>	1.3	<i>Nigrospora oryzae</i>	0.9		
	Wallemiales		3.8	<i>Nigrospora</i>	0.9	<i>Ustilaginoidea virens</i>	0.7		
	Tremellales		1.6	<i>Ustilaginoidea</i>	0.7	<i>Pyrenochaetopsis leptospora</i>	0.3		
	Trichosphaeriales		0.9	<i>Alfaria</i>	0.4	<i>Hannaella sinensis</i>	0.3		
<i>Setophoma</i>	0.1								
储藏 3 a	Ascomycota	82.1	Eurotiales	25.6	<i>Aspergillus</i>	24.7	<i>Aspergillus penicillioides</i>	14.3	
	Basidiomycota	14.2	Capnodiales	20.1	<i>Wallemia</i>	7.4	<i>Wallemia canadensis</i>	6.8	
			Hypocreales	17.4	<i>Sarocladium</i>	4.3	<i>Sarocladium strictum</i>	2.7	
			Pleosporales	13.4	<i>Alternaria</i>	3.5	<i>Nigrospora oryzae</i>	2.3	
			Wallemiales	7.1	<i>Nigrospora</i>	2.3	<i>Brassica carinata</i>	1.8	
			Tremellales	4.4	<i>Ustilaginoidea</i>	0.5	<i>Hannaella sinensis</i>	1.4	
			Trichosphaeriales	2.3	<i>Alfaria</i>	0.3	<i>Pyrenochaetopsis leptospora</i>	0.8	
			<i>Setophoma</i>	0.2	<i>Ustilaginoidea virens</i>	0.5			

2.2.2 目水平 对于入库前的稻谷田间真菌构成,相对丰度占优势的菌目为煤炱目(Capnodiales)占47.2%、格孢腔菌目(Pleosporales)占23.9%、肉座菌目(Hypocreales)占14.4%,而假毛球壳目(Trichosphaeriales)占4.8%、银耳目(Tremellales)占3.7%、散囊菌目(Eurotiales)仅占1.1%。储藏1 a,稻谷真菌构成为格孢腔菌目(Pleosporales)占34.4%、煤炱目(Capnodiales)占17.9%、肉座菌目(Hypocreales)占15.7%,银耳目(Tremellales)占6.6%、散囊菌目(Eurotiales)仅占4.3%,而假毛球壳目(Trichosphaeriales)占0.8%、节担菌目(Wallemiales)占0.5。储藏2 a,稻谷真菌目构成为散囊菌目(Eurotiales)占56.1%、煤炱目(Capnodiales)占19.5%、格孢腔菌目(Pleosporales)占8.2%、肉座菌目(Hypocreales)占6.5%、节担菌目(Wallemiales)占3.8%、银耳目占1.6%、假毛球壳目占0.9%。储藏3 a,稻谷真菌目构成为散囊菌目(Eurotiales)占25.6%、煤炱目(Capnodiales)占20.1%、肉座菌目(Hypocreales)占17.4%、格孢腔菌目(Pleosporales)占13.4%、节担菌目(Wallemiales)占7.1%、银耳目占4.4%、假毛球壳目占2.3%。通过仓储,稻谷真菌构成优势菌目逐渐由煤炱目(Capnodiales)转变为散囊菌目(Eurotiales)。

2.2.3 属水平 对于入库前的稻谷田间真菌构成,相对丰度占优势的菌属为枝孢属(*Cladosporium*)占45.8%,链格孢属(*Alternaria*)占11.9%,附球菌属(*Epicoccum*)占9.7%,赤霉菌属(*Gibberella*)占3.2%,其余鉴定出的真菌属含量均较低。储藏1 a,受数据库内已完成测序的真菌基因组数据限制,在属水平上未能分类的真菌占绝大部分,而鉴定到属水平的真菌只占小部分。稻谷真菌属构成为 *Alfaria* 占4.7%,*Setophoma* 占4.5%,曲霉属(*Aspergillus*)占3.9%,绿核菌属(*Ustilaginoidea*)占3.1%,其余鉴定出的真菌属含量均较低。储藏2 a,稻谷真菌属构成为曲霉属(*Aspergillus*)占53.7%,节担菌属(*Wallemia*)占3.8%,链格孢属(*Alternaria*)占1.8%,其余鉴定出的真菌属含量均较低。储藏3 a,稻谷真菌属构成为曲霉属(*Aspergillus*)占24.7%,节担菌属(*Wallemia*)占7.4%,链格孢属(*Alternaria*)占1.8%,帚枝霉属(*Sarocladium*)4.3%,链格孢霉属(*Alternaria*)占3.5%。可见,经过仓储后稻

谷真菌属构成由入库前的枝孢菌(*Cladosporium*)占优势转化为曲霉属(*Aspergillus*)占优势。

2.2.4 种水平 对于入库前的稻谷田间真菌构成,相对丰度占优势的菌种为黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)占9.2%,玉米赤霉菌(*Gibberella zeae*)占1.2%,层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)占1.1%,*Gliocladium cibotii* 占1.7%,其余鉴定出的真菌种含量均较低。储藏1 a,稻谷真菌种构成为稻绿核菌(*Ustilaginoidea virens*)占3.1%,*Pyrenochaetopsis leptospora* 占2.0%,*Brassica carinata* 占1.3%,帚状曲霉(*Aspergillus penicillioides*)占1.1%,其余鉴定出的真菌种含量均较低。储藏2 a,稻谷真菌种构成为帚状曲霉(*Aspergillus penicillioides*)占22.8%,*Wallemia canadensis* 占3.6%,其余鉴定出的真菌种含量均较低。储藏3 a,稻谷真菌种构成为帚状曲霉(*Aspergillus penicillioides*)占14.3%,*Wallemia canadensis* 占6.8%。紧密帚枝霉(*Sarocladium strictum*)占2.7%,菌稻黑孢霉(*Nigrospora oryzae*)占2.3%,*Brassica carinata* 占1.8%,其余鉴定出的真菌种含量均较低。经过仓储后,稻谷真菌种构成由入库前的黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)占优势逐渐转化为帚状曲霉(*Aspergillus penicillioides*)占优势。

在鉴定出的上述真菌中,有一些是可以产生毒素的,如玉米赤霉菌(*Gibberella zeae*),是禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)的子囊阶段,禾谷镰刀菌是赤霉病的主要病原菌,主要引起小麦、大麦和元麦的赤霉病,也可以感染玉米和水稻等,能产生脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol,简称DON)、玉米赤霉烯酮(ZEN)和T-2毒素(T-2 toxin)等^[18]。层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)等镰刀菌在适宜的温度和湿度条件下可产生伏马毒素(又称烟曲霉毒素,Fumonisin,FB)^[19-21]。错综赤霉(*Gibberella intricans*)是木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)的子囊阶段,广泛分布于许多植物的根、茎基、果实、种子中,可造成植物枯萎病及根腐,能产生单端孢霉烯(Trichothecenes)类毒素、如T-2毒素,脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON),雪腐镰刀菌烯醇(Nivalenol, NIV)和二醋酸蔗草镰刀菌烯醇(Diacetoxyscirpenol, DAS)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)、新茄病镰刀菌烯醇(Neosolaniol)和丁烯酸内酯(Butenolide)等毒素^[22-23]。

3 结论

田间真菌对水稻收获后的储藏具有较大影响,明确稻田间真菌群落结构对调控储藏条件、抑制真菌繁殖及产生毒素具有一定指导意义。从黑龙江省五常地区采集的 3 个水稻品种稻花香样本,其田间真菌、储藏 3 a 期间储藏真菌群落构成有显著变化。从优势菌构成来看,稻谷入库前田间真菌群落构成为子囊菌门(Ascomycota)占绝对优势(94.4%);煤炱目(Capnodiales, 47.2%)、格孢腔菌目(Pleosporales, 23.9%)和肉座菌目(Hypocreales, 14.4%)为优势目;枝孢菌(*Cladosporium*, 45.8%)和链格孢属(*Alternaria*, 11.9%)为优势属;黑附球菌(*Epicoccum nigrum*, 9.2%)为优势种。入库储藏 3 a 后,这些稻谷储藏真菌群落构成演化为子囊菌门(Ascomycota)仍占绝对优势,但比重由 94.4% 下降为 82.1%;散囊菌目(Eurotiales, 25.6%)和煤炱目(Capnodiales, 20.1%)为优势目;曲霉属(*Aspergillus*, 24.7%)和节担菌属(*Wallemia*, 7.4%)为优势属;帚状曲霉(*Aspergillus penicillioides*, 14.3%)为优势种。其中某些植物病原菌可能会在适宜的条件下产生真菌毒素,对稻谷质量安全构成潜在风险。因此,有必要加强稻谷储藏管理及例行监测,防止真菌繁殖,避免稻谷质量下降及真菌毒素的产生。

参考文献:

- [1] Cho J C, Giovannoni S J. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 432-440.
- [2] Gilbert J A, Field D, Huang Y, et al. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities[J]. PLoS One, 2008, 3(8): e3042.
- [3] Qin J J, Li R Q, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.
- [4] Yatsunenko T, Rey F E, Manary M J, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. Nature, 2012, 486(7402): 222-227.
- [5] Teixeira L C R S, Peixoto R S, Cury J C, et al. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica[J]. The ISME Journal, 2010, 4(8): 989-1001.
- [6] Urich T, Lanzén A, Qi J, et al. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome[J]. PLoS One, 2008, 3(6): e2527.
- [7] 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.
- [8] 智楠楠, 宗凯, 杨捷琳, 等. Illumina Miseq 平台深度测定酸奶中微生物多样性[J]. 食品工业科技, 2016, 37(24): 78-82.
- [9] 洪家丽, 李秋艺, 潘雨阳, 等. 红曲黄酒传统酿造过程挥发性风味组分及微生物菌群多样性分析[J]. 食品科学, 2019(12): 137-144.
- [10] 马晓平, 向奇, 李德生, 等. 大熊猫被毛可培养真菌的分离鉴定与系统发育学分析[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(1): 72-81.
- [11] Magoc T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [12] Caparose J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [13] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59.
- [14] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [15] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [16] Koljalg U, Larsson K H, Abarenkov K, et al. UNITE: A database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi[J]. New Phytologist, 2005, 166(3): 1063-1068.
- [17] Nguyen N H, Song Z W, Bates S T, et al. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild[J]. Fungal Ecology, 2016, 20: 241-248.
- [18] Desjardins A E, Proctor R H. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119: 47-50.
- [19] Magoha H, Kimanya M, De M B, et al. Risk of dietary exposure to aflatoxins and fumonisins in infants less than 6 months of age in Rombo, Northern Tanzania[J]. Maternal & Child Nutrition, 2016, 12(3): 516-527.
- [20] Matic S, Spadaro D, Prella A, et al. Light affects fumonisin production in strains of *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium verticillioides* isolated from rice[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(3): 515-523.
- [21] Desjardins A E, Manhanadhar H K, Plattner R D, et al. *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66: 1020-1025.

[22] Kosiak E B, Holst-Jensen A, Rundberget T, et al. Morphological, chemical and molecular differentiation of *Fusarium equiseti* isolated from Norwegian cereals[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99:195-206.

[23] Leslie J F, Summerall B A, Bullock S. The *Fusarium* Laboratory Manual[M]. Iowa, USA: Blackwell Pub Professional, 2006.

Study on Field and Storage Fungal Community Diversity in *Japonica* Rice of Heilongjiang Province

YANG Huan-chun¹, LI Yong¹, SHAN Hong², LI Li-li², LAN Jing², ZHAO Lin², SUN Xiang-dong²
(1. Anshun University, Anshun 561000, China; 2. Quality and Safety Institute of Agricultural Products, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to promote reasonable storage and quality safety of paddy rice in Heilongjiang Province, three freshly harvested rice samples were collected in 2016 and stored for 1, 2, and 3 years, then analyzed through high-throughput sequencing of Illumina Hiseq to investigate the composition of storage fungal community. These rice samples were conducted high-throughput sequencing of ITS region, species composition, abundance, alpha diversity, and community structure were also analyzed. The results indicated that through three years storage, the storage fungal community in rice samples changed to as follow: Ascomycota was still the absolute predominant phylum, however the proportion declined from 94.4% to 82.1%; Eurotiales (25.6%) and Capnodiales (20.1%) were the predominant order; *Aspergillus* (24.7%) and *Wallemia* (7.4%) were the predominant genus; *Aspergillus penicillioides* (14.3%) was the predominant specie. Fungal species composition of rice samples stored for different times were abundant and differences of fungal composition structure existed among these rice samples.

Keywords: *japonica* rice; field fungi; community structure; diversity; functional prediction

(上接第 85 页)

Effects of Drought Stress on Leaf Protective Enzymes of Five Tree Species

CHEN Yi-lan^{1,2}, ZHAO Wen-zhong³, LI Xin-jie³, WANG Xiang-ping³, ZHANG Sha⁴, LIU Dong-ming¹
(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. The highway development company in Hebei qugang, Dingzhou 073000, China; 4. Huizhou institute of forestry science, Huizhou 516000, China)

Abstract: Under the background of global warming and fresh water shortage, the drought resistance is a primary consideration for picking plants for public green space and road greening. In this article, we selected potentially drought-tolerant *Salix matsudana*, *Ulmus pumila*, *Melia azedarach*, *Triadica sebifera*, and *Populus tomentosa* for our drought stress experiments, and measured four physiological indices of leaf, including malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT). Then we discussed, based on response of leaf protective enzyme system to drought stress of these tree species, and evaluated comprehensive membership functions. The results showed that *Populus tomentosa* had the strongest drought tolerance among the five species, and *Melia azedarach* had better synergistic effect against drought. The membership function values of *Salix matsudana*, *Ulmus pumila*, *Melia azedarach*, *Triadica sebifera* and *Populus tomentosa* were 0.36, 0.30, 0.39, 0.53 and 0.82, respectively. The drought tolerance was ranked as *Populus tomentosa* > *Triadica sebifera* > *Triadica sebifera* > *Salix matsudana* > *Ulmus pumila*. *Populus tomentosa*, *Melia azedarach* and *Sapium sebiferum* could be preferred in greening practice.

Keywords: drought stress; protective enzyme; membership function; drought tolerance