戴宝玲,杨　华,戴贤君,等. 小麦真菌结构分析及其与呕吐毒素含量的关系[J]. 江苏农业科学,2019,47(12):228 – 232.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2019.12.053

小麦真菌结构分析及其与呕吐毒素含量的关系

戴宝玲[1,2], 杨　华[2], 戴贤君[1], 王佩佩[1,2], 温雪婷[2], 肖英平[2]
(1. 中国计量大学生命科学学院,浙江杭州 310018; 2. 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所,浙江杭州 310021)

摘要:旨在阐明污染小麦的真菌的结构组成并分析污染小麦的真菌与麦粒中呕吐毒素(DON)浓度之间的关系。采用高效液相色谱法(HPLC)测定麦粒中的 DON 含量,选取 DON 浓度为高、中、低[DON 含量分别为(2 982 ±1 534)、(972 ±251)、(42 ±1) μg/kg]的小麦样品各 12 份,抽提 3 组小麦微生物 DNA 进行真菌测序。结果表明,通过基因组 DNA 提取、高通量测序、生物信息学分析后,共得到 820 个运算分类单元(operational taxonomic unit,简称 OTU)。基于不同分类水平的分析可知,其优势菌门为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota),平均相对丰度分别为 46.964 0% 、0.722 1%;优势菌属为链格孢属(*Alternaria*)、附球菌属(*Epicoccum*),分别占 16.987 9% 、5.570 1%。3 组小麦中的真菌物种数量有显著差异($P < 0.05$)。由研究结果可知,小麦中存在一定的病原真菌污染,如链格孢属(*Alternaria*)、葡萄孢属(*Botrytis*),有必要对携带真菌毒素 DON 小麦中的真菌结构进行检测,并分析两者间的关系。

关键词:小麦;高效液相色谱;呕吐毒素;高通量测序;菌群结构
中图分类号: S432.4⁺4　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 – 1302(2019)12 – 0228 – 05

小麦是三大谷物之一,是一种在世界各地被广泛种植的禾本科植物,起源于中东新月沃土地区,是世界上人们最早栽培的农作物之一,其营养丰富,经济价值较高[1]。作为我国重要的粮食作物,小麦的种植区域非常广阔,北到黑龙江,南到海南岛[2]。但是由于受到地理位置及气候的影响,一些地区所产小麦会受到真菌污染,徐文静等于 2015 年对安徽省 5 个地级市小麦的真菌污染情况进行调查发现,其污染率为 100%[3]。真菌在适宜的条件下可能会产生有毒的代谢产物——真菌毒素,目前研究发现的 300 多种真菌毒素中约有 20 种对人类和动物有确定的毒性作用[4]。其中脱氧血腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol,简称 DON),又称呕吐毒素,是小麦中常见的污染真菌毒素,DON 毒性较稳定,在加工过程中也很难将其毒性破坏,进入食物链后,会对人畜的健康造成一定的威胁[5]。因此,有必要对小麦呕吐毒素和真菌污染情况进行调查,并分析两者之间的关系。高效液相色谱法具有高压、高速、高效、高灵敏度、应用范围广的“四高一广”特点,可以用此方法检测小麦样品中呕吐毒素的含量。高通量测序技术的出现克服了一些试验技术具有的通量低、信息量小、成本高的缺陷[6],随着其快速发展,目前已经成为微生物群落研究中非常重要的工具[7]。

1　材料与方法

1.1　材料和仪器

1.1.1　样品来源与试验设计　取浙江省 2016 年产小麦,依据呕吐毒素含量分成高(H)、中(M)、低(L)3 组,每组 12 份样品,用于分析其中的真菌结构,小麦呕吐毒素 H、M、L 组平均含量分别为(2 982 ±1 534)、(972 ±251)、(42 ±1) μg/kg。

1.1.2　仪器　高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;荧光分光光度计,上海精密仪器仪表有限公司;Illumina 测序仪,Illumina 公司;PCR 扩增仪,德国 Biometra 公司。

1.2　DNA 的提取及扩增

采用 ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research)对小麦的 DNA 进行提取。用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行进一步检测。以提取的 DNA 为模板,用 ITS2 引物 ITS3 – 2024F (5′ – GCATCGATGAAGAACGCAGC – 3′)和 ITS4 – 2409R(5′ – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3′)对小麦真菌 DNA 进行 PCR 扩增,对 PCR 产物进行内转录间隔区(internal transcribed spacer,简称 ITS)测序分析。

1.3　DNA 测序和质量控制

用荧光分光光度计测得提取的 DNA 浓度,选取浓度在 40 ~ 100 ng/μL、$D_{260\ nm/280\ nm}$ 在 1.8 ~ 2.0 之间的 DNA,用 Illumina Hiseq 平台高通量技术进行测序。

1.4　生物信息学分析

采用 Illumina 测序技术对小麦中真菌 ITS 的 ITS2 区域进行扫描测序,得到的图像数据经 Base Calling 转化为序列数据,再用 QIIME 软件(Quantitative Insights Into Microbial Ecology, V 1.7.0, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html)对序列进行质控和过滤,得到高质量的 DNA 序列[8-9]。根据相似性≥97% 的原则将通过质控的有效序列聚类成为操作分类单元(operational taxonomic unit,简称 OTU)[10],基于 OTU 聚类分析结果,进行香农指数分析,基于分类学信息,分别在门、属水平上进行小麦真菌菌群结构的统计与分析。

1.5　统计分析

采用 SPSS 统计软件进行方差分析(ANOVA),来比较不

收稿日期:2018 – 01 – 19
基金项目:浙江省植物有害生物防控重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地项目(编号:2010DS700124 – ZM1608)。
作者简介:戴宝玲(1992—),女,河南信阳人,硕士,研究方向为食品微生物。E – mail:bldaihz123@126.com。
通信作者:肖英平,博士,助理研究员,研究方向为农产品质量安全。E – mail:ypxiaozju@126.com。

同 DON 浓度的小麦真菌相对丰度的差异，对有显著性差异的处理进行 t 检验。

2　结果与分析

2.1　小麦中真菌物种的丰度及多样性

通过小麦基因组 DNA 提取、高通量测序、生物信息学分析后共得到 820 个 OTUs，根据相似性≥97% 的原则，以抽取的序列数与它们所能代表的 OTU 数构建曲线，即稀释性曲线（rarefaction curve）[11]，绘制的曲线均趋于平缓（图 1），说明小麦样品测序数据量合理，能够覆盖小麦中的所有真菌并能真实反映物种的多样性组成。

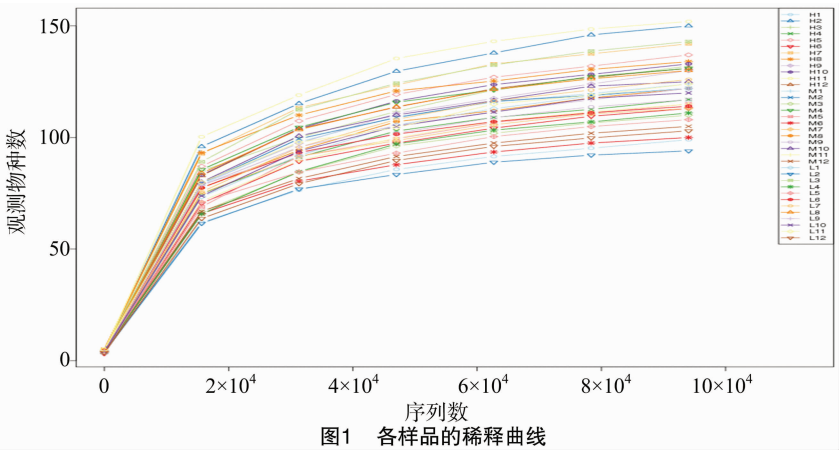


图1　各样品的稀释曲线

2.2　基于门、属水平对小麦上携带的真菌群落结构的分析

2.2.1　门水平的小麦真菌群落结构分析　从微生物分类门的水平可知，本研究收集的小麦样品中主要包含子囊菌门（Ascomycota）、担子菌门（Basidiomycota）、纤毛亚门（Ciliophora）、接合菌门（Zygomycota）和球囊菌门（Glomeromycota）等。其中子囊菌门、担子菌门是小麦真菌的优势菌门，均 100% 被检出，其相对丰度分别为 46.9640%（变化范围为 12.399 6% ~82.496 1%）、0.722 1%（变化范围为 0.103 2% ~1.877 3%），详见表 1。

表 1　在门水平上小麦的主要真菌群落结构相关分析

名称	平均相对丰度（%）	检出数（门）	检出率（%）	检出率中位数（%）	检出率范围（%）
子囊菌门（Ascomycota）	46.964 0	36	100	21.521 7	12.399 6 ~82.496 1
担子菌门（Basidiomycota）	0.722 1	36	100	0.105 3	0.103 2 ~1.877 3
纤毛亚门（Ciliophora）	0.005 0	25	69	0	0 ~0.062 8
接合菌门（Zygomycota）	0.000 7	4	11	0	0 ~0.020 2
球囊菌门（Glomeromycota）	0.000 1	1	3	0	0 ~0.004 3
其他	52.308 0	36	100	78.373 0	16.789 2 ~86.766 5

2.2.2　属水平的小麦真菌群落结构分析　从属的水平上分析可知，小麦中真菌最大丰度排名前 35 的属中，17 个真菌属在小麦中 100% 被检出，检出率 >90% 的真菌属有 24 个，其中优势菌属为链格孢属（*Alternaria*）、附球菌属（*Epicoccum*），平均相对丰度分别为 16.987 9%、5.570 1%，中位数分别为 4.634 2%（变化范围为 2.634 6% ~41.050 2%）和 2.358 6%（变化范围为 0.778 6% ~16.341 4%），详见表 2。

2.3　基于门、属水平对小麦中真菌和 DON 关系的分析

2.3.1　样品测序概况　测序后进行菌群结构的多样性分析，由图 2 可以看出，3 种不同浓度 DON 处理的小麦样品平均分别获得（131 ± 23）、（117 ± 13）、（118 ± 13）个 OTUs，其中 H 组小麦真菌的物种数量与 M、L 组有显著差异（P <0.05）；菌群多样性指数（香农指数）在 3 组间无显著差异（图 2）。

2.3.2　基于门水平对小麦中真菌相对丰度和 DON 关系的分析　从门的水平上分析可知，小麦中高浓度 DON 组（H 组）的子囊菌门、担子菌门的平均相对丰度分别为（40.287 8 ± 9.067 9）%、（0.688 6 ± 0.035 3）%，均低于中浓度 DON 组（M 组）的（51.784 4 ± 3.170 1）%、（0.755 7 ± 0.069 2）% 和低浓度 DON 组（L 组）的（48.819 9 ± 49.052 0）%、（0.722 0 ± 0.427 2）%。H 组和 M 组的子囊菌门相对丰度有显著差异（P <0.05）；纤毛亚门、接合菌门和球囊菌门的相对丰度在 3 组间均无明显差异，详见图 3。

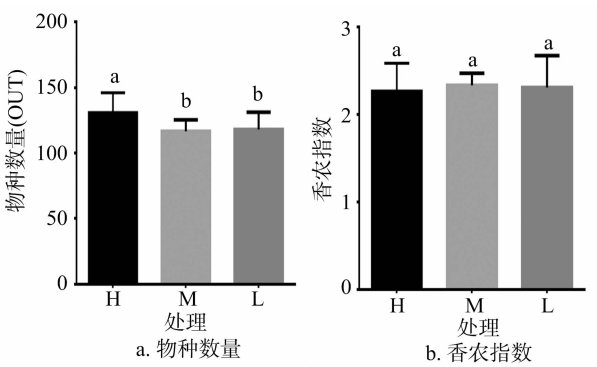
2.3.3　基于属水平对小麦中真菌相对丰度和 DON 关系的分析　如图 4 所示，从属水平上分析可知，小麦中真菌最大丰度排名前 35 的属中，前 12 个属中链格孢属的丰度相对较高，L 组的平均相对丰度为（22.573 2 ± 2.126 9）%，高于 M 组［（19.448 2 ± 4.477 9）%］、H 组［（8.942 4 ± 1.708 7）%］组，H 组链格孢属与 L、M 组间均有显著差异（P <0.05）。附球菌属的平均丰度次之，L 组与 M、H 组间均有显著差异（P <0.05）。此外，本研究的检测结果显示，存在一定量葡萄孢属、镰刀菌属的病原真菌。*Monographella*、隐球菌属、曲霉属、短梗霉属、掷孢酵母属、*Pyrenophora* 和匍柄霉属的相对丰度在 3 组间均无明显差异。

2.4　小麦样品的主坐标分析

根据 3 组中各个小麦样品的 OTU 计算样品间的加权 UniFrac 距离，再进行主坐标分析（PCoA）。由图 5 可见，

表 2　小麦中丰度排名前 35 的属

属名	平均相对丰度（%）	检出数（属）	检出率（%）	检出率中位数（%）	检出率范围（%）
链格孢属（*Alternaria*）	16.987 9	36	100	4.634 2	2.634 6～41.050 2
附球（真）菌属（*Epicoccum*）	5.570 1	36	100	2.358 6	0.778 6～16.341 4
Monographella	0.665 0	36	100	0.077 6	0.052 1～5.329 8
隐球菌属（*Cryptococcus*）	0.443 6	36	100	0.049 5	0.044 7～1.329 5
曲霉属（*Aspergillus*）	0.312 8	36	100	0.026 1	0.004 3～6.136 0
短梗霉属（*Aureobasidium*）	0.251 6	36	100	0.0659	0.056 4～0.853 0
掷孢酵母属（*Sporobolomyces*）	0.181 8	36	100	0.036 2	0.022 3～0.580 7
Pyrenophora	0.089 4	36	100	0.009 6	0.007 4～1.577 3
葡萄孢属（*Botrytis*）	0.076 0	36	100	0.026 1	0.019 1～0.380 8
匍柄霉属（*Stemphylium*）	0.075 3	36	100	0.023 9	0.012 8～0.393 5
镰刀菌属（*Fusarium*）	0.064 5	36	100	0.007 4	0.003 2～0.691 3
离蠕孢霉属（*Bipolaris*）	0.055 8	36	100	0.020 2	0.006 4～0.168 1
Diaporthe	0.035 6	36	100	0.010 1	0.004 3～0.148 9
Bulleromyces	0.023 8	35	97	0.002 1	0～0.115 9
Dioszegia	0.019 6	35	97	0.005 8	0～0.041 5
弯孢（霉）属（*Curvularia*）	0.016 9	36	100	0.009 6	0.002 1～0.052 1
拟茎点霉属（*Phomopsis*）	0.016 0	35	97	0.009 0	0～0.090 4
节担菌属（*Wallemia*）	0.013 9	33	92	0.000 5	0～0.105 3
Ophiosphaerella	0.012 0	36	100	0.002 1	0.001 1～0.052 1
腥黑粉菌属（*Tilletia*）	0.011 5	31	86	0.002 7	0～0.085 1
小球腔菌属（*Leptosphaeria*）	0.011 4	36	100	0.006 9	0.002 1～0.031 9
疱霉属（*Phoma*）	0.010 3	33	92	0.007 4	0～0.094 7
明脐菌属（*Exserohilum*）	0.009 6	36	100	0.003 7	0.001 1～0.048 9
赤霉属（*Gibberella*）	0.008 0	34	94	0.004 8	0～0.071 3
布勒掷孢酵母属（*Bullera*）	0.007 5	34	94	0.002 7	0～0.045 7
Udeniomyces	0.004 3	27	75	0	0～0.020 2
Didymella	0.001 7	18	50	0	0～0.024 5
Shiraia	0.001 6	15	42	0	0～0.020 2
瓶霉属（*Phialophora*）	0.001 4	3	8	0	0～0.052 1
嗜热真菌属（*Thermomyces*）	0.001 4	16	44	0.000 5	0～0.016 0
假裸囊菌属（*Pseudogymnoascus*）	0.000 8	7	19	0	0～0.022 3
Paraphoma	0.000 8	9	25	0	0～0.016 0
被孢霉（*Mortierella*）	0.000 7	6	17	0	0～0.020 2
Tubaria	0.000 5	3	8	0	0～0.017 0
Lectera	0.000 4	4	11	0	0～0.014 9



a. 物种数量　　b. 香农指数

不同处理间标有不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。图 2、图 3、图 4 同

图2　小麦中真菌样品的测序概况

PCo1、PCo2 分别解释了 17.78%、10.67% 的差异性。各处理样可以分为 2 个大集合，可以很明显地看出，L 组与 H、M 组间的差异较大，H 组和 M 组可视为一簇，即污染毒素浓度低的小麦中的真菌菌群丰度（L 组）与污染毒素高的小麦中的真菌菌群丰度（H 组和 M 组）存在差异。小麦中的呕吐毒素与其真菌菌群丰度呈一定的相关性。

3　讨论

呕吐毒素是一种真菌毒素，主要分布在谷物中，尤其是小麦中，人和动物长期大量食用被 DON 污染的小麦后会抑制蛋白质的合成，导致呕吐、腹泻、厌食、神经紊乱等毒性效应[12-14]。因此，被 DON 污染的小麦存在一定的膳食风险，应进一步对小麦进行真菌菌群结构的研究分析。

基于分类学门的水平上分析可知，小麦样品中子囊菌门和担子菌门为优势菌门，这与史亚千等的研究结果[15]相符。子囊菌门、担子菌门真菌属于病原真菌，研究发现，有些土壤真菌可能引起植物病害、影响作物产量甚至导致植物死亡[16]。张敏等对小麦根际土壤真菌群落结构进行分析发现，子囊菌门和担子菌门为优势菌门[17]，说明土壤可能是小麦污

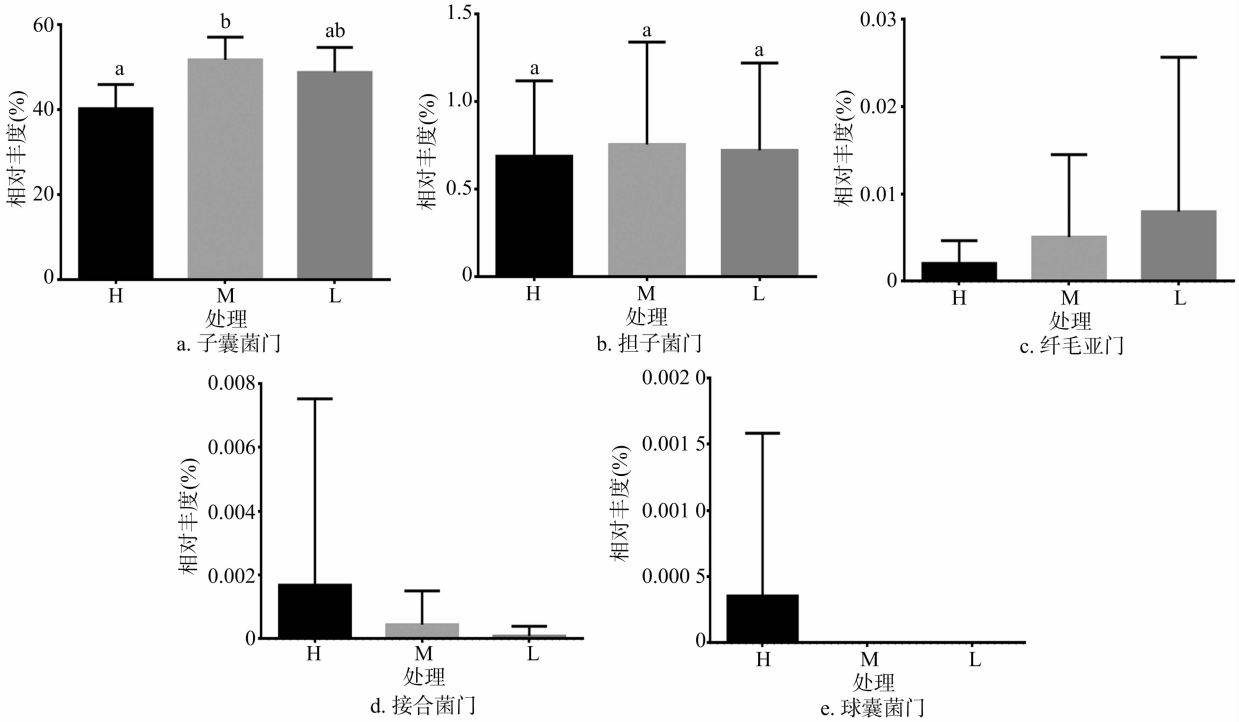


图3　门水平的小麦真菌群落相对丰度

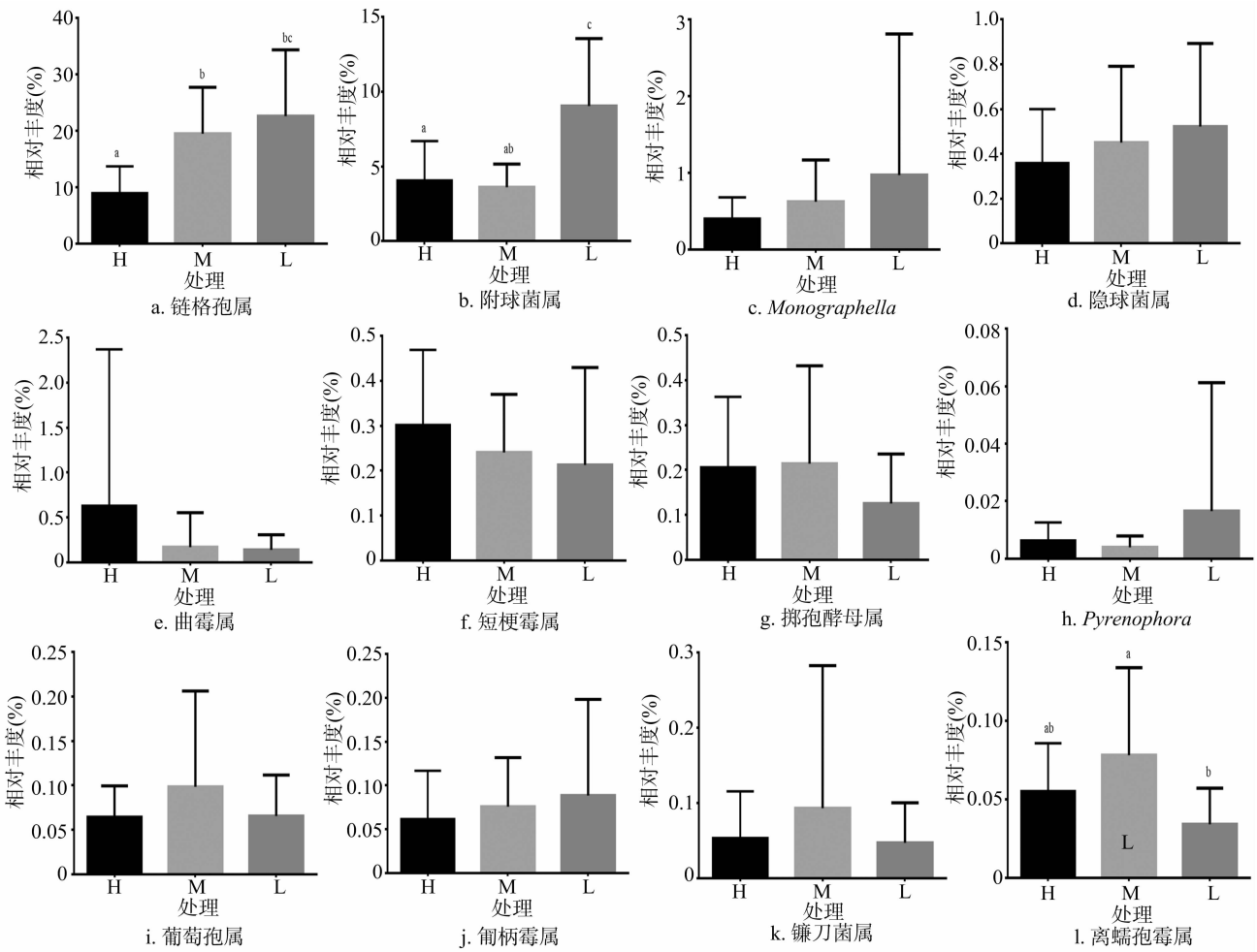


图4　属水平的小麦真菌群落相对丰度

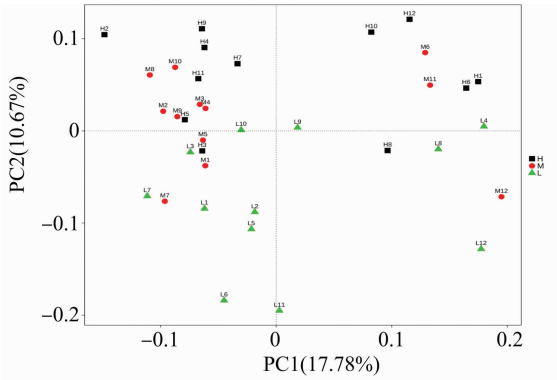


图5　各样品真菌菌落结构的主坐标分析

染病原真菌导致其病害的原因之一。

基于分类学属水平的分析显示,小麦样品中的链格孢属和附球菌属为优势菌属。链格孢属真菌是一类广泛分布在自然界中的真菌,除了可引起农作物病变外,还可使农产品腐烂变质,并危及农产品的食用安全[18]。有些链格孢属真菌还具有一定的产毒能力,是农作物的主要致病菌之一,人或动物一旦摄入被链格孢毒素污染的食物,可能导致急性或慢性中毒,某些链格孢毒素还有致畸、致癌、致突变作用[19]。从小麦中检测发现的葡萄孢属真菌属于一种广泛分布的植物病原真菌[20],此外,在许多不同的寄主上发现了许多葡萄孢新种[21-23],它们可导致多种作物灰霉病的发生。镰刀菌属和其有性阶段的赤霉属均被检出,都可产生 DON,它们都是具有破坏性的植物病原真菌,可引起小麦的赤霉病。

4　结论

本研究用高效液相色谱法测定了 36 份麦粒中的 DON 含量。通过基因组 DNA 提取、高通量测序、生物信息学分析后共得到 820 个 OTUs。基于不同分类水平的分析可知,小麦中的优势菌门为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota),其平均相对丰度分别为 46.964 0%、0.722 1%。优势菌属为链格孢属(*Alternaria*)、附球菌属(*Epicoccum*),分别占 16.987 9%、5.570 1%。可以看出,小麦中存在一定的病原真菌污染,应引起重视。

参考文献:

[1]高忠臣. 论北方地区小麦播种期病虫害防治[J]. 农民致富之友,2017(1):79.

[2]徐朝根. 皖东南平畈圩区小麦高产栽培技术的探讨[J]. 农业开发与装备,2016(11):139.

[3]徐文静,韩小敏,张　靖,等. 安徽省部分地区 2015 年产小麦真菌污染调查[J]. 山东大学学报,2016,54(9):92-96.

[4]雷　方,李承龙,张　新,等. 免疫磁珠亲和纯化-超高效液相色谱串联质谱法快速检测小麦中多种真菌毒[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(3):1252-1260.

[5]付　杨,李洪军,贺稚非,等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇研究进展[J]. 食品科学,2011,32(21):289-292.

[6]Goodwin S,McPherson J D,McCombie W R. Coming of age:ten years of next-generation sequencing technologies[J]. Nature Reviews Genetics,2016,17(6):333-351.

[7]Segata N,Boernigen D,Tickle T L,et al. Computational meta' omics for microbial community studies[J]. Molecular Systems Biology,2013,9(1):666-666.

[8]Caporaso 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.

[9]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.

[10]Edgar R C. UPARSE:highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods,2013,10(10):996-998.

[11]Amato K R,Yeoman C J,Kent A,et al. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes[J]. The ISME Journal,2013,7(7):1344-1353.

[12]Ji F,Xu J H,Liu X,et al. Natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in wheat from Jiangsu Province,China[J]. Food Chemistry,2014,157(157):393-397.

[13]Pestka J J. Deoxynivalenol:mechanisms of action,human exposure,and toxicological relevance[J]. Archives of Toxicology,2010,84(9):663-679.

[14]Pestka J J. Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol[J]. World Mycotoxin Journal,2010,3(4,SI):323-347.

[15]史亚千,程颖慧,王　颖,等. 应用高通量测序技术对进境澳大利亚小麦病原真菌的检测研究[J]. 植物检疫,2017,31(1):26-31.

[16]Mendes R,Garbeva P,Raaijmakers J M. The rhizosphere microbiome:signicance of plant benecial,plant pathogenic,and human pathogenic microorganism[J]. FEMS Microbiology Reviews,2013,37(5):634-663.

[17]张　敏,周　鹏,季永华. 苦楝-小麦农林复合生态系统土壤真菌群落结构分析[J]. 林业科学,2015,51(10):26-34.

[18]López P,Venema D,Mol H,et al. *Alternaria* toxins and conjugates in selected foods in the Netherlands[J]. Food Control,2016,69:153-159.

[19]Bensassi F,Gallerne C,El Dein O S,et al. Cell death induced by the *Alternaria mycotoxin* Alternariol[J]. Toxicology in Vitro,2012,26(6):915-923.

[20]吴明德. 葡萄孢属植物病原菌真菌病毒研究[D]. 武汉:华中农业大学,2012.

[21]Zhang J,Wu M D,Li G Q,et al. *Botrytis fabiopsis*,a new species causing chocolate spot of broad bean in central China[J]. Mycologia,2010,102(5):1114-1126.

[22]Zhang J,Zhang L,Li G Q,et al. *Botrytis sinoallii*:a new species of the grey mould pathogen on *Allium* crops in China[J]. Mycoscience,2010,51(6):421-431.

[23]Li X,Kerrigan J,Chai W,et al. *Botrytis caroliniana*,a new species isolated from blackberry in South Carolina[J]. Mycologia,2012,104(3):650-658.