

基于高通量测序探究东北粳稻储藏期间 真菌群落的演替

李欣蔚

(辽宁省农科院粮食科学研究所, 辽宁沈阳 110032)

摘要: 为探究不同初始水分的东北粳稻在模拟实仓环境储藏的条件下, 稻谷中真菌群落随储藏时间的演替变化。选取水分在 14.50%~15.50%的稻谷 HW 和 13.50%~14.50%稻谷 LW, 进入模拟储藏实验。结果表明, 在第一和第二储藏期高水分稻谷 HW 水分含量由 15.50%降低至 15.09%, 低水分稻谷 LW 水分含量由 14.21%降低至 13.59%, 直至第三储藏期保持平稳。基于可操作性分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs) 的物种分类分析, 两种水分的稻谷真菌群落经历了不同的演替变化。高水分稻谷在每个储藏期, 真菌群落都发生了明显演替, 稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)、金黄色蝶形担孢酵母 (*Papiliotrema aurea*)、弯孢菌 (*Curvularia inaequalis*)、黑孢霉 (*Neosetophoma samararum*)、汉纳酵母菌 (*Hannaella sinensis*) 在储存结束时成为了最终的优势菌种。低水分稻谷在第二储藏期真菌群落发生明显演替, 优势菌种为弯孢菌 (*Curvularia inaequalis*)、汉纳酵母菌 (*Hannaella sinensis*)、*Hannaella zeae*。

关键词: 高通量测序; 稻谷; 真菌; 群落演替

文章编号: 1673-9078(2022)07-98-106

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.1064

High-throughput Sequencing-based Analysis of the Succession of Fungal Communities during the Storage of Northeast Japonica Rice

LI Xinwei

(Liaoning Grain Science Research Institute, Shenyang 110032, China)

Abstract: To explore the succession of the fungal communities of the northeast japonica rice with different initial moistures under the conditions simulating those of the real storage ware house environment. The rice with a moisture content of 14.50%~15.50%, HW, and the rice with a moisture content of 13.50%~14.50%, LW, were used for the simulated storage experiments. The results showed that the moisture contents of the HW rice and LW rice decreased from 15.50% to 15.09% and from 14.21% to 13.59%, respectively, in the first and second storage periods, and remained stable in the third storage period. According to the taxonomic analysis based on operational taxonomic units (OTUs), the fungal communities of the two types of rice underwent different successional changes. The fungal community of the HW rice exhibited obvious succession during each storage period, and *Magnaporthe grisea*, *Papiliotrema aurea*, *Curvularia inaequalis*, *Neosetophoma samararum*, *Hannaella sinensis* became the final dominant species at the end of storage. The fungal community of the LW rice experienced obvious succession in the second storage, *Curvularia inaequalis*, *Hannaella sinensis* and *Hannaella zeae* became the dominant species.

Key words: high-throughput sequencing; rice; fungi; community succession

引文格式:

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 Xinwei. High-throughput sequencing-based analysis of the succession of fungal communities during the storage of northeast japonica rice [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 98-106

水稻是我国主要粮食作物。在我国每年都会有大量的稻谷进入仓库储藏^[1]。稻谷一般储备轮换年限是 3

收稿日期: 2021-09-23

基金项目: 中国博士后基金项目 (254358)

作者简介: 李欣蔚 (1987-), 女, 博士, 工程师, 研究方向: 食品微生物、

粮食储藏, E-mail: xinweili.love@163.com

年^[2]。在储藏阶段, 当储藏条件 (环境温度、环境湿度) 达到适合真菌生长的条件时, 真菌便会利用稻谷中的碳源大量生长繁殖, 而真菌的不断繁殖又会使得环境温度升高, 真菌产生的真菌毒素^[3], 食用后威胁人类健康^[4]。稻谷在储藏过程中脂肪酸值的变化最为敏感, 因此可以通过测定脂肪酸值来判断稻谷的脂质

陈化程度^[5]。

传统的平板分离法需要对样品进行微生物的分离、纯化、接种再培养分析,其中可培养的微生物只占总微生物的不到10%。因此对于稻谷中的真菌群落结构及多样性的探究,传统的平板分离法不能够实现^[6,7]。而以样品中提取的全部微生物DNA为研究对象的高通量测序技术可以提供更加可靠的技术支持^[8]。高通量测序技术采用大量构建宏基因文库,利用分子生物学信息比对手段,研究样品中宏基因组中所包含的全部微生物信息,如微生物的遗传组成以及微生物的菌群结构、群落功能等,因此可以全面反映微生物群落组成情况及多样性。目前已广泛应用于海洋^[9,10]、肠道^[11,12]、土壤^[13,14]、粮食作物^[15]、食品饮料^[16,17],甚至动物表皮^[18]等不同生态类型的微生物群落结构剖析,在农业、食品、医疗等领域发挥着重要作用^[19]。

稻谷脂质的陈化和霉菌的生长是造成储藏稻谷品质劣变的重要因素,往往发生在新收获稻谷储藏前期^[20]。因此,本研究将以东北新收获早粳稻为研究对象,

选取稻谷水分在14.50%~15.50%的稻谷HW和水分含量在13.50%~14.50%稻谷样品LW,杂质≤0.30%,模拟实仓储藏条件进行模拟储藏,跟踪18个月的储藏期进行定期取样检测。采用高通量测序技术分析不同初始水分含量的稻谷在模拟实仓储藏条件下,不同储藏时期稻谷真菌群落的演替变化。为储藏期间特定霉菌的防霉体系建立提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品采集

以东北早粳稻稻谷作为研究对象,对新收获的高水分早粳稻进行自然晾干,通过水分测定仪测定,选取稻谷水分在14.50%~15.50%的稻谷HW和水分含量在13.50%~14.50%稻谷样品LW,杂质≤0.30%,进入模拟仓进行模拟储藏,跟踪18个月的储藏期进行定期取样检测。

表1 取样表

Table 1 The table of samples

取样时间	2020.3.11	2020.9.18	2021.3.26	2021.9.1
储藏条件(℃, %)	16.20℃, 52%	20.20℃, 55%	16.50℃, 69%	23.30℃, 71%
样品命名	HW/LW	HWS1/LWS1	HWS2/LWS2	HWS3/LWS3

模拟仓长宽均为1.10 m,高1.80 m,利用通风方式,将储藏条件调节为实仓储藏条件(温度17℃~25℃,相对环境湿度Relative Humidity, RH: 45% RH~75% RH),粮面高度为1.20 m。按照实仓条件进行模拟储藏,储藏温度、湿度及取样时间如表1(储藏条件为即时计数)。按照表中条件各取样150.00 g,称取50.00 g于无菌均质袋中作为3个平行样品,于实验室中4℃保存。

1.1.2 仪器和设备

PH-240(A)鼓风干燥箱, JXFM110型锤式旋风磨。

1.1.3 试验试剂

无水乙醇、酚酞指示剂、0.025 mol/L的氢氧化钾标准滴定液。

1.2 试验方法

1.2.1 水分的测定

参照GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》第一法直接干燥法测定样品水分含量。

1.2.2 脂肪酸值的测定

参照GB/T 15684-2015《谷物碾磨制品脂肪酸值的测定》测定样品脂肪酸值。

1.2.3 样品基因组DNA提取及PCR扩增

采用Miseq-PE250测序平台,利用Illumina公司的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit制备测序文库。将合格的各上机测序文库梯度稀释后,根据所需测序量按相应比例混合,并经NaOH变性为单链进行上机测序。

1.2.4 数据分析

使用MiSeq测序仪进行双端测序,利用QIIME2 dada2分析软件、Vsearch软件进行序列去噪和OTU聚类,利用QIIME2、R语言ggplot2包进行Alpha多样性、Beta多样性分析以及分类学组成分析,利用R脚本、VenDiagram包、plotrix包制作OTU韦恩图和PCA主成分分析,利用R脚本、pheatmap包绘制聚类热图。

2 结果与分析

2.1 样品水分、脂肪酸值变化情况

如图1,两组稻谷水分含量在储藏第一、第二储藏期均有所下降,直至第三储藏期保持平稳。其中,高水分稻谷HW水分含量由15.50%降低至15.09%;低水分稻谷LW水分含量由14.21%降低至13.59%,低水分稻谷LW下降幅度更大(14.21%降至13.59%)。

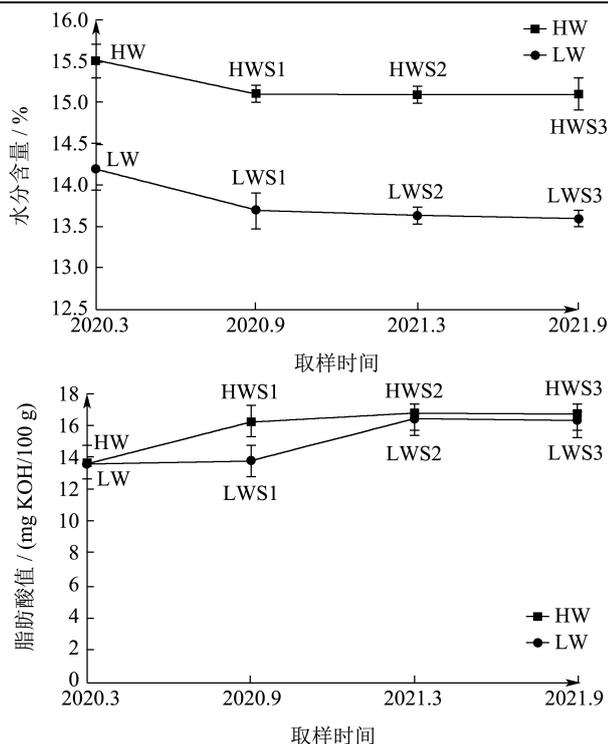


图1 稻谷水分和脂肪酸值变化

Fig.1 The changes of moisture and fatty acid values of samples

两组稻谷脂肪酸值的变化趋势呈现差异。其中，高水分稻谷 HW 脂肪酸值在第一储藏期有所上升，由初始状态 13.61 mg KOH/100 g 升高至 16.27 mg KOH/100 g，在第二储藏期升高幅度有所减少，由 16.20 mg KOH/100 g 升高至 16.72 mg KOH/100 g，在

第三储藏期脂肪酸值趋于稳定 16.66 mg KOH/100 g。而低水分稻谷组 LW 在第一储藏期脂肪酸值保持稳定趋势 (13.61~13.73 mg KOH/100 g)，在第二储藏期升幅剧烈 (13.73~16.41 mg KOH/100 g)，并在第三储藏期趋于稳定 (16.27 mg KOH/100 g)。由此可见，两组水分的稻谷的水分、脂肪酸值的变化均在第三储藏期趋于稳定，这意味着两组稻谷中真菌群落所处的微生态环境趋于稳定。因此选取原始状态下的两种水分稻谷 (HW、LW)，第一储藏期和第二储藏期结束后的稻谷 (HWS1、HWS2、LWS1、LWS2) 进行宏基因组的提取和 ITS 区的测序，进而对其真菌群落的演替进行分析。

2.2 样本数据统计

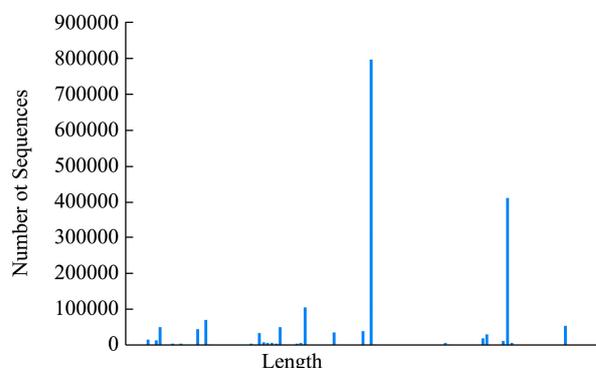


图2 稻谷序列长度分布图

Fig.2 The length distribution chart of the optimized sequence

表2 稻谷的测序数据

Table 2 High-throughput sequencing data of samples

样品名称	原始序列量	拼接后的序列量	高质量序列量
HW	179179.33±2068.65	161396.00±3887.92	150293.00±4350.41
LW	167330.67±12868.08	150043.00±15885.75	144639.33±13189.78
HWS1	89533.67±5298.52	60410.00±6514.73	59382.00±6749.87
LWS1	109580.00±15911.76	78824.33±13599.74	77722.33±12918.08
HWS2	114826.67±8294.06	106661.00±7812.13	101162.67±6560.41
LWS2	119340.67±7732.72	110256.33±7099.98	105634.00±7220.64

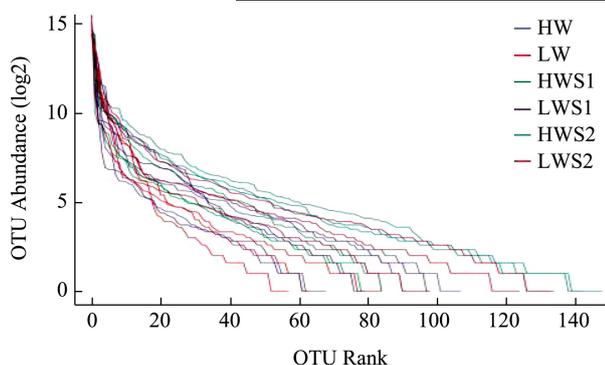


图3 稻谷的丰度等级曲线

Fig.3 Rank abundance curve of the rice

采用 Illumina 平台对群落 DNA 片段进行双端 (Paired-end) 测序。18 份稻谷样品所产生的有效序列数量通过分组求平均值，如表 2 所示，其中 HW 样品获得了较多的原始序列量 179179 和高质量序列量 150293。18 份样品共有 799295 条有效序列长度为 226，有 412472 条有效序列长度为 259，如图 2。

样品的丰度等级曲线是将样本中的 OTU 按其丰度大小沿横坐标依次排列，并以各自的丰度值为纵坐标，从而反映各样本中 OTU 丰度的分布规律。如图 3，LW 曲线跨度最小，折线最陡峭，说明低水分稻谷进入储藏前 OTU 数较少，且均匀度较低。而样品 HWS1，

HWS2 跨度最大,折线平缓,说明高水分稻谷进入储藏后 OTU 数量开始增多,且群落组成的均匀度较高,群落中的物种开始生长繁殖。这说明,原始水分含量和储藏时间有助于稻谷真菌群落丰富度和均匀度的增长。

2.3 稻谷中真菌的分类单元统计

利用自编 perl 脚本分析软件,通过对抽平后的 ASV/OTU 进行统计,可以获得每个样本中的微生物群落各分类水平的具体组成,可以计算不同样本在各分类水平所含有的分类单元数目。依据序列物种分类学注释的结果以及选择的样品,统计这些样本的物种注释结果中门、纲、目、科、属、种六个分类水平各自含有的分类单元的数量。如图 4,不同的分类水平由不同颜色标识,柱子高度对应分类单元数量。两

种水分稻谷在门的水平下的分类单元数量随着储藏时间的延长均有所增加。

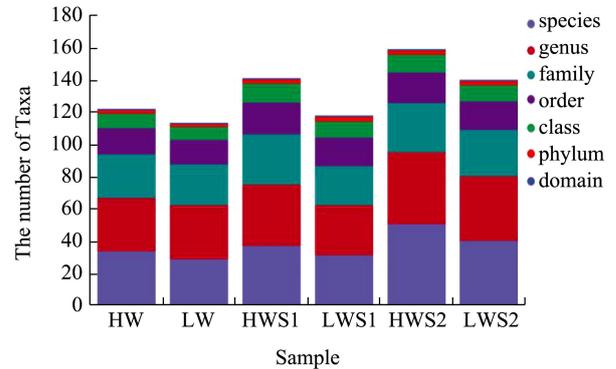


图 4 稻谷的分类学注释结果统计图

Fig.4 Statistical chart of rice in annotation taxonomy

2.4 稻谷中真菌群落多样性指数性分析

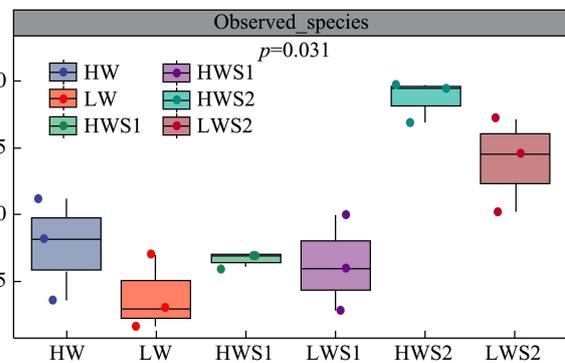
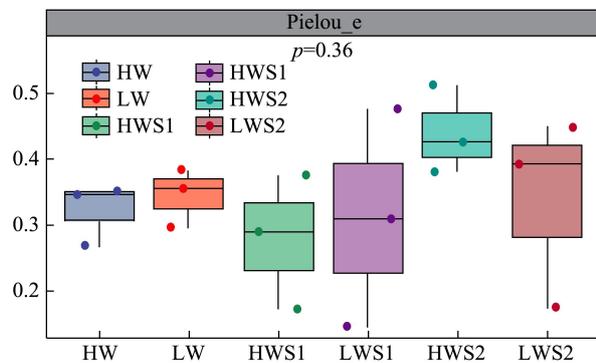
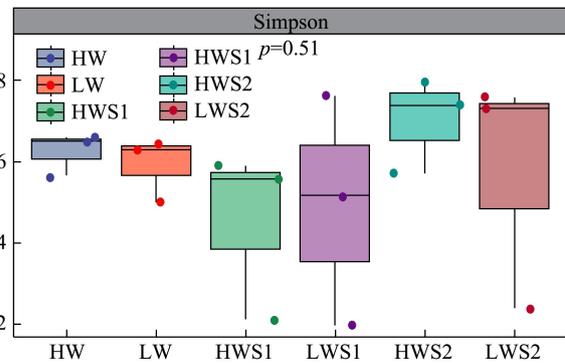
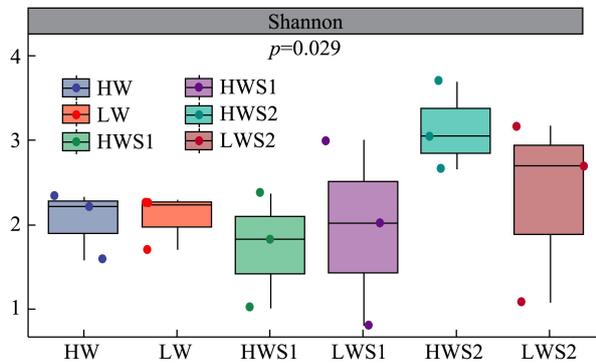
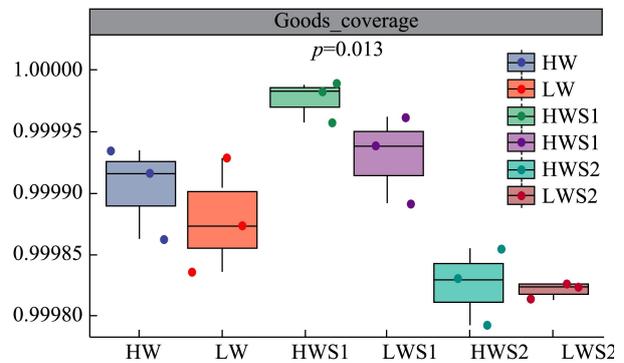
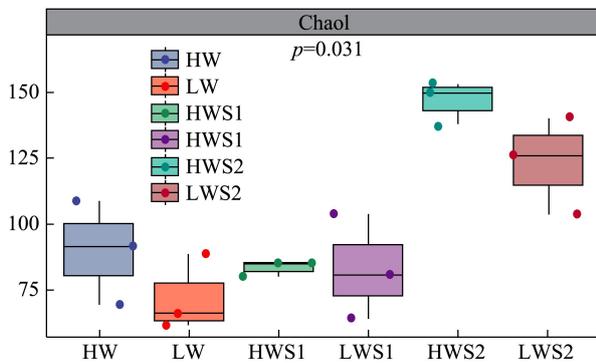


图 5 稻谷多样性指数箱线图

Fig.5 The diversity index box plots of samples

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^[21]和 Observed species 指数表征样品真菌菌群丰富度, 以 Shannon^[22]和 Simpson^[23]指数表征多样性, 以 Pielou's evenness^[24]指数表征均匀度, 以 Good's coverage^[25]指数表征覆盖度。如图 5 箱线图中, 18 份稻谷样本的 Coverage 指数均达到 0.99, 说明测序结果的覆盖度符合要求。

Chao1, Simpson 指数, 高水分组稻谷先下降, 后上升, 多样性呈现先降低后升高的趋势, HWS2>HW>HWS1; 而低水分组稻谷多样性呈现逐渐上升的趋势, LW<LWS1<LWS2。这说明与低水分稻谷相比, 高水分稻谷进入储藏前已携带种类较多的真菌 (HW>LW), 而进入储藏以后这部分真菌受到储藏条件的限制而大量死亡, 因此多样性指数开始下降 (HWS1<HW)。由于稻谷本身水分偏高, 这为储藏真菌的生长繁殖提供了适宜环境, 因此随着储藏时间的延长高水分稻谷的真菌多样性指数开始升高 (HWS2>HW>HWS1)。而低水分稻谷由于自身水分偏低, 进入储藏前携带的真菌种类较少, 进入储藏后储藏真菌开始大量繁殖, 因此随着储藏时间的延长, 多样性指数呈现逐渐上升的趋势 (LW<LWS1<LWS2)。由此可见, 稻谷本身的水分含量越高越有利于真菌的生存。

2.5 稻谷中真菌在不同分类水平下的组成差异分析

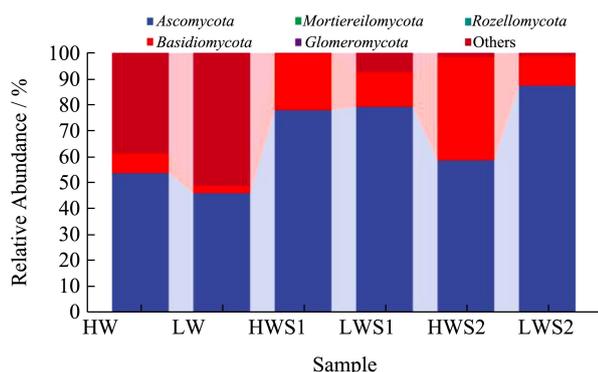


图 6 在门的水平下的组成差异

Fig.6 Composition differences at the level of the phylum

如图 6, 两种水分稻谷在不同储藏时期的真菌群落在门的水平上分类为 5 个菌门, 分别为子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、羊肚菌门 (Mortierellomycota)、球囊菌门 (Glomeromycota)、罗兹菌门 (Rozellomycota)。其中子囊菌门 (Basidiomycota) 真菌在高水分稻谷 (HW) 中, 随着储藏时间的延长, 其数量呈现先增加后减少的趋势

(HW, 53.20%; HW1, 74.60%; HW3, 55.80%)。而在低水分稻谷 (LW) 中, 随着储藏时间的延长, 其数量表现为持续增加的趋势 (HW, 44.60%; HW1, 73.90%; HW2, 85.40%)。担子菌门 (Basidiomycota) 真菌在高水分稻谷 (HW) 中随储藏时间的延长数量持续增加 (HW, 11.20%<HWS1, 2.40%<HWS2, 39.80%); 而在低水分稻谷 (LW) 中随储藏时间的延长数量先增加后减少 (LW, 3.20%<LWS1, 12.20%>LWS2, 8.60%)。

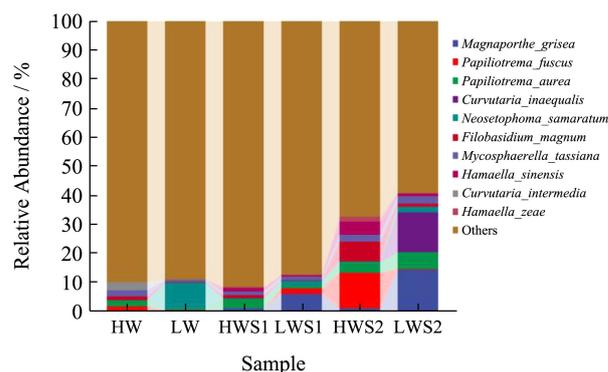


图 7 在种的水平下的组成差异

Fig.7 Composition differences at the genus level

两种水分稻谷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, 如表 3。其中稻瘟病菌 (*Magnaporthe_grisea*)、金黄色蝶形担孢酵母 (*Papiliotrema_aurea*)、弯孢菌 (*Curvularia_inaequalis*)、黑孢霉 (*Neosetophoma_samaratum*)、汉纳酵母菌 (*Hannaella_sinensis*) 在高水分稻谷 HW 样品中的相对丰度随着储藏时间的延长逐渐上升 (HW<HWS1<HWS2); 黑粉菌 (*Filobasidium_magnum*)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe_grisea*)、*Hannaella_zeae* 的相对丰度随着储藏时间的延长呈现先升高后降低的趋势 (HW<HWS1>HWS2); *Papiliotrema_fuscus* 的相对丰度则是随着储藏时间的延长先降低后上升 (HW>HWS1<HWS2); 弯孢菌 (*Curvularia_inaequalis*) 经历第一次储藏期后相对丰度降为 0, 可以认为该物种在高水分稻谷中几乎消失。在低水分稻谷中, 弯孢菌 (*Curvularia_inaequalis*)、汉纳酵母菌 (*Hannaella_sinensis*)、*Hannaella_zeae* 在最初取样时的相对丰度为 0, 而在经历两个储藏期后相对丰度有所上升 (LW<LWS1<LWS2); 黑孢霉 (*Neosetophoma_samaratum*)、黑粉菌 (*Filobasidium_magnum*)、*Mycosphaerella_tassiana*、弯孢菌 (*Curvularia_inaequalis*) 的相对丰度随着储藏时间的延长持续降低 (LW>LWS1>LWS2); 稻瘟病菌 (*Magnaporthe_grisea*)、*Papiliotrema_fuscus*、金黄色蝶形担孢酵母

(*Papiliotrema aurea*) 的相对丰度先上升后降低 (LW<LWS1>LWS2)。其中, 稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)、金黄色蝶形担孢酵母 (*Papiliotrema aurea*)、弯孢菌 (*Curvularia inaequalis*)、黑孢霉 (*Neosetophoma samararum*)、汉纳酵母菌 (*Hannaella sinensis*) 在高水分稻谷中占有较大比例, 且随着储藏期的延长, 其丰度持续上升, 这与徐园程^[26]在 20 °C, 43% RH 储藏条件下稻谷的主要菌种是黑孢霉 (*Neosetophoma samararum*)、弯孢菌 (*Curvularia inaequalis*) 的结果一致。其中黑孢霉 (*Neosetophoma samararum*)、弯孢菌 (*Curvularia inaequalis*) 会引起一种症状与稻瘟病相似的新型叶斑病, 其病原尚无鉴定报道, 会严重影响水稻产量及品质^[27]。因此控制稻谷进入储藏前的水分含量来减少病

原真菌的产生^[28], 才能从源头上保证稻谷品质的品质安全。而与此不同的是, 有学者通过对安徽省国属粮库中籼稻样品进行优势菌种的分析发现, 曲霉菌属是储藏期稻谷的优势菌属之一^[29]。微生物的群落变化是微生物本身与其所处环境 (稻谷品质、环境温湿度) 相互作用的结果, 不同环境中的同种微生物或者同一环境中的不同微生物生长和代谢均存在着差异^[30]。因此可以推测, 稻谷的品种以及产地可能是影响储藏期间优势菌种的原因之一。值得注意的是, 两种水分的稻谷在第二储藏期结束时也存在共有的优势菌种, 如弯孢菌 (*Curvularia inaequalis*)、汉纳酵母菌 (*Hannaella sinensis*)。其中弯孢菌 (*Curvularia inaequalis*) 为过渡真菌, 意味着随后会向储藏真菌演替^[31]。

表 3 各优势菌种在样品中所占丰度

Table 3 Abundances of dominant species in the samples

菌种名称	HW	HWS1	HWS2	LW	LWS1	LWS2
<i>Magnaporthe grisea</i>	0.00016270	0.00742688	0.00779496	0.00003756	0.05840620	0.14181342
<i>Papiliotrema fuscus</i>	0.01403625	0.00165835	0.12249289	0.00223683	0.01866674	0.00128645
<i>Papiliotrema aurea</i>	0.02108901	0.03148909	0.03453988	0.00407832	0.00825890	0.05961002
<i>Curvularia inaequalis</i>	0.00000000	0.00000000	0.00053448	0.00000000	0.00000000	0.13671160
<i>Neosetophoma samararum</i>	0.00198579	0.00209046	0.00334847	0.08908796	0.01776424	0.01874860
<i>Filobasidium magnum</i>	0.01163401	0.00978249	0.07041111	0.00270128	0.00256993	0.01241165
<i>Mycosphaerella tassiana</i>	0.02210611	0.01494828	0.02399584	0.00998678	0.01310693	0.02411421
<i>Hannaella sinensis</i>	0.00004130	0.01094157	0.04327819	0.00000000	0.00392326	0.00983259
<i>Curvularia intermedia</i>	0.02746624	0.00000000	0.00000000	0.00000960	0.00008130	0.00000000
<i>Hannaella zeae</i>	0.00000000	0.00319127	0.01761622	0.00000000	0.00088545	0.00153745

2.6 稻谷中真菌的物种组成及丰度热图

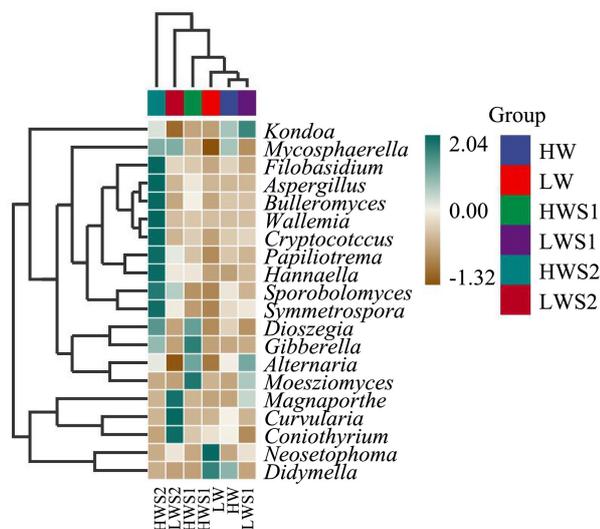


图 8 不同水分稻谷中真菌物种组成热图

Fig.8 The heatmap of the fungi communities in rice with different moisture content

为了进一步比较样本间的物种组成差异, 实现对各样本的物种丰度分布趋势的展示, 可以使用热图进行物种组成分析, 默认使用平均丰度前 20 位的属的丰度数据绘制热图。如图 8。在高水分稻谷 HW 中, 随着储藏时间的延长, 线黑粉酵母菌属 (*Filobasidium*)、曲霉菌属 (*Aspergillus*)、白布勒担孢酵母菌属 (*Bulleromyces*)、节担菌属 (*Wallemia*)、隐球菌属 (*Cryptococcus*)、*Papiliotrema*、汉纳酵母菌属 (*Hannaella*)、*Sporobolomyces*、*Symmetrospora* 的相对丰度增加, 菌属 *Didymella*、*Kondoa* 的相对丰度降低; 在低水分稻谷 LW 中, 随着储藏时间的延长, 菌属 *Neosetophoma*、*Didymella* 的相对丰度降低, 到第二储藏期时相对丰度降为 0; 菌属 *Magnaporthe*、*Curvularia*、*Coniothyrium*、*Neosetophoma* 的相对丰度增加。同时, 在储藏初期, 高水分稻谷 (HW) 和低水分稻谷 (LW) 中真菌的群落组成具有相似性, 其优势菌属均为 *Neosetophoma*、*Didymella*。到了第二储藏期, 高水分稻谷 (HWS2) 和低水分稻谷 (LWS2) 中

真菌的群落组成在属的水平上发生变化, 优势菌属发生了明显的演替, 有研究表明这是由于储藏过程中稻谷的代谢产物累积后产生了相互抑制的作用^[32,33]。

2.7 不同水分稻谷真菌群落差异分析

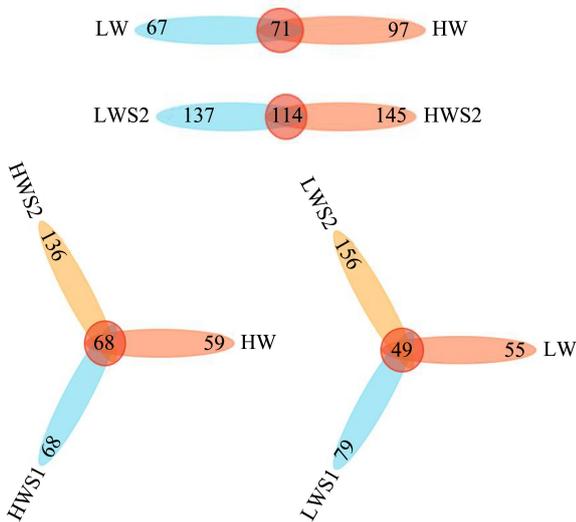


图9 不同水分、不同储藏期稻谷物种差异性比较 Ven 图

Fig.9 The Ven plot of the samples

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。

通过 Ven 图进行群落分析, 可以探究不同样本间共有物种和独有物种, 如图 9。通过高水分稻谷 (HW) 和低水分稻谷 (LW) 进行对比发现, HW 与 LW 共有的 OTU 数量为 71 个, HW 具有的特性 OTU 数量较多为 97 个。随着储藏时间的延长, 通过 HWS2 与 LWS2 对比发现, 两组样品共有的 OTU 数量增加至 114, 两组样品各自具有的特性 OTU 增加至 137 和 145。在高水分稻谷 HW 储藏阶段, 三个储藏期的样品具有的共同 OTU 数量为 68 个, 储藏的时间越长, 样品具有的特性 OTU 数量越多 (HW<HWS1<HWS2); 在低水分稻谷 LW 储藏阶段, 三个储藏期的样品具有的共同 OTU 数量为 49 个, 随着储藏时间的延长, 样品具有的特性 OTU 数量越多 (LW<LWS1<LWS2)。由此可见, 在进入储藏前高水分稻谷的真菌群落丰富度高于低水分稻谷, 而随着储藏的进行, 高水分稻谷的真菌群落丰富度依然高于低水分稻谷。而尽管是低水分稻谷, 在储藏阶段其真菌群落物种丰富度也在增加。通过高通量测序技术可以获取到很多真菌种类及其丰度方面的信息, 但也只有一部分真菌会在储藏条件下进一步生长发育并且需要在一定条件下对稻谷产生不良影响^[34]。

2.8 Beta 多样性分析

依据 Yurkov^[35]的方法对两种水分的稻谷进行 PCA 分析 (Principal Component Analysis)。如图 10, 图中不同水分含量、不同储藏期的稻谷中真菌群落距离越近, 则表示群落相似度高。其中, 高水分稻谷和低水分稻谷在第一储藏期 (HWS1 和 LWS1) 位置相对较近, 说明这两种状态下的稻谷样品中真菌群落多样性差异较小; 低水分稻谷在原始状态和第一储藏期 (LW 和 LWS1) 的位置相对较近, 说明低水分稻谷在第一储藏期内的真菌群落多样性变化较小; 而低水分稻谷在第二储藏期 (LWS2) 与低水分稻谷其他储藏期的样品位置较为分散, 说明其真菌群落多样性差异较大。而高水分稻谷 (HW、HWS1、HWS2) 在三个储藏状态下位置间均相对分散, 说明稻谷样品直接真菌群落物种多样性差异较大。由此可见, 低水分稻谷在第一储藏期之前的真菌群落多样性变化较小, 进入第二储藏期后真菌群落多样性增加; 而高水分稻谷在每个储藏期的真菌群落多样性均有所增加, 真菌群落发生明显演替。

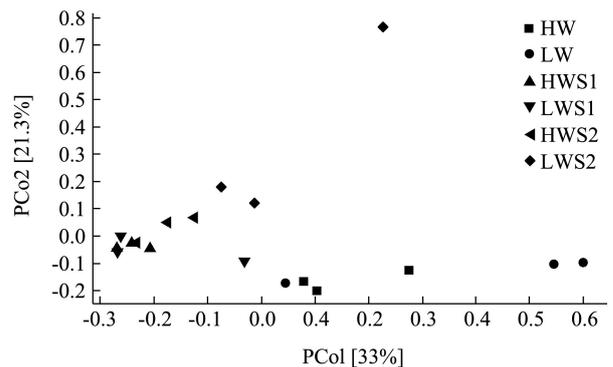


图 10 不同水分稻谷中真菌的主成分分析图

Fig.10 Principal component analysis of mould in rice with different moisture content

3 结论

本实验通过测定不同初始水分含量的稻谷在不同储藏期的水分、脂肪酸值的变化趋势, 确定了将第一、第二以及原始样品作为高通量测序的研究对象来分析稻谷中真菌群落的演替变化。采用 Illumina 平台对 18 份稻谷样品的 DNA 片段进行双端测序后发现, 高水分稻谷的多样性先降低后升高; 而低水分稻谷的多样性持续升高。由此可见, 水分仍是从储藏源头抑制真菌活动的关键因素。通过对 OTU 进行物种分类, 结果表明, 两种水分的稻谷随着储藏时间的延长, 其真菌群落经历了不同的演替变化, 高水分稻谷在每个储藏期, 真菌群落都发生了明显演替。到第二储藏期时, 稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)、金黄色蝶形担孢酵母 (*Papiliotrema aurea*)、弯孢菌 (*Curvularia*)

inaequalis)、黑孢霉 (*Neosetophoma_samararum*)、汉纳酵母菌 (*Hannaella_sinensis*) 成为了高水分稻谷中的优势菌种。而低水分稻谷在第一储藏期内, 真菌群落并没有发生明显的演替变化, 但是真菌群落的组成和丰度持续增加, 而在第二储藏期结束后真菌群落才发生演替, 到第二储藏期时, 弯孢菌 (*Curvularia_inaequalis*)、汉纳酵母菌 (*Hannaella_sinensis*)、*Hannaella_zeae* 成为了优势菌种。因为活跃的真菌活动会影响粮堆温度甚至是储藏温度, 因此在储藏条件不受人工干预时, 两种水分的稻谷都会发生由田间真菌向储藏真菌的演替。为了有效抑制演替现象的发生, 在储藏前期应及时采取空调控温或通风措施来抑制微生物活动导致的持续高温, 以此来保证储粮安全。

参考文献

- [1] 罗思媛,郭红英,张杰.我国控温储粮的现状与研究进展[J].粮食科技与经济,2017,5:41-43
LUO Siyuan, GUO Hongying, ZHANG Jie. Current situation and research progress of temperature controlled grain storage in China [J]. Grain Science and Technology and Economy, 2017, 5: 41-43
- [2] 薛飞,渠琛玲,王若兰,等.稻谷储藏过程中发热霉变研究进展[J].食品工业科技,2017,12(38):34-38
XUE Fei, QU Shenling, WANG Ruolan, et al. Progress on the fever and moldy of paddy during storage [J]. Food Industry Science and Technology, 2017, 12(38): 34-38
- [3] Mohamed M, Deok K K. Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grainstorage [J]. Mycobiology, 2017, 45(4): 240-254
- [4] Ferre, Sempere F. Worldwide occurrence of mycotoxins in rice [J]. Food Control, 2016, 62: 291-298
- [5] 蔡巍.鲁西地区高大平房仓储散粮稻谷品质变化规律研究[J].粮食储藏,2018,47(3):38-47
CAI Wei. Study on the changing principle of bulk rice stored in tall bungalow in Luxi region [J]. Grain Storage.2018, 47(3): 38-47
- [6] Shi Y W, Kai L, Chun L, et al. Illumina-based analysis of bacterial diversity related to halophytes *Salicornia europaea* and *Suaeda aralocaspica* [J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(10): 678-685
- [7] Alain K, Querellou J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges [J]. Extremophiles, 2019, 13(4): 583-594
- [8] 彭芳芳,魏召新,李勋兰,等.基于高通量测序分析感染菌核病和健康桑果内生菌群落结构及多样性[J].食品科学,2020, 11(20):61-68
PENG Fangfang, WEI Zhaoxin, LI Xunlan, et al. Analysis of diversity and community structure of endophytes in sclerotinia sclerotiorum-infected and healthy mulberry fruits by high-throughput sequencing [J]. Food Science, 2020, 11(20): 61-68
- [9] Cho J C, Giovannoni S J. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine gamma proteobacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 432-440
- [10] 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, 2018, 3(8): 3042-3044
- [11] Qin J J, Li R Q, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2020, 464(7285): 59-65
- [12] 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
- [13] Teixeria 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
- [14] Urich T, Lanzen A, Qi J, et al. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome [J]. Plos One, 2018, 3(6): 25-27
- [15] 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].中国农业大学学报,2016, 49(7):1371-1381
DU Lihui, HE Xiaoying, LIU Lingping, et al. Fungal diversity and culturable dominant fungi during storage of Huaidao 5 [J]. China Agricultural University, 2016, 49(7): 1371-1381
- [16] 智楠楠,宗凯,杨捷琳,等.Illumina Meq 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
ZHI Nannan, ZONG Kai, YANG Jieli, et al. Microbial diversity in yoghurt by Illumina MEQ [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(24): 78-82
- [17] 洪家丽,李秋艺,潘雨阳,等.红曲黄酒传统酿造过程中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
HONG Jiali, LI Qiuyi, PAN Yuyang, et al. Analysis of volatile flavor components and microbiome diversity of red

- koji rice wine during traditional production [J]. Food Science, 2019, 12: 137-144
- [18] 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分析[J].中国兽医科学,2017,47(1):72-81
MA Xiaoping, XIANG Qi, LI Desheng, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of culturable fungi from the hair of giant panda [J]. China Veterinary Science, 2017, 47(1): 72-81
- [19] 马岩石,姜明,李慧,等.基于高通量测序技术分析东北豆酱的微生物多样性[J].食品工业科技,2020,41(12):100-105
MA Yanshi, JIANG Ming, LI Hui, et al. Biodiversity and microbial diversity of soybean soybean in China [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 100-105
- [20] 郑云飞.不同储藏期稻谷品质、霉菌区系和真菌毒素的差异性研究[D].南京:南京财经大学,2020
ZHENG Yunfei. The research of differences of rice quality, fungal flora and mycotoxins in different storage periods [D]. Nanjing: Nanjing University of Finance and Economics, 2020
- [21] Chao A, Shen T J. Nonparametric prediction in species sampling [J]. Journal of Agricultural Biological and Environmental Statistics, 2004, 9: 253-269
- [22] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Research, 2003, 13: 2498-2504
- [23] Simpson E H. Measurement of diversity [J]. Nature, 1949, 163: 688
- [24] Pielou E C. The measurement of diversity in different types of biological collections [J]. Journal of Theoretical Biology, 1966, 13: 131-144
- [25] Good I J. The population frequency of species and the estimation of the population parameters [J]. Biometrics, 1958, 40: 237-246
- [26] 徐圆程,刘慧,王光宇,等.基于高通量测序分析储藏稻谷中的真菌群落结构与优势菌属[J].食品科学,2020,41:92-99
XU Yuancheng, LIU Hui, WANG Guangyu, et al. High-throughput sequencing was used to analyze the fungal community structure and dominant bacteria genera of stored rice [J]. Food Science, 2020, 41: 92-99
- [27] 徐辉,侯冕,檀根甲,等.水稻弯孢叶斑病原鉴定及其生物学特性[J].安徽农业大学学报,2020,47(1):129-134
XU Hui, HOU Mian, TAN Genjia, et al. Identification and characterization of causal organism of rice *Curvularia* leaf spot disease [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2020, 47(1): 129-134
- [28] Adekoyeni O O, Akinoso R, Adegoke A F, et al. Effects of storage and processing parameters on pasting properties of ofada for production of boiled and mashed rice [J]. Czech Journal of Food Science, 2018, 36(3): 239-245
- [29] 葛志文,周建新,方勇,等.不同储藏年限稻谷真菌群落多样性与优势菌属探究[J].中国粮油学报,2021,36(3):129-134
GE Zhiwen, ZHOU Jianxin, FANG Yong, et al. The research of fungi diversity and dominant bacteria in rice of different storage years [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(3): 129-134
- [30] 曹佳璐,张列兵.韩国泡菜乳酸菌研究进展[J].中国食品学报,2017,17(10):184-193
CAO Jialu, ZHANG Liebing. Research progress on kimchi lactic acid bacteria [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(10): 184-193
- [31] 王鹏杰,祁智慧,张海洋,等.辽宁地区稻谷粮堆真菌分布及演替规律的研究[J].中国粮油学报,2020,35(5):144-151
WANG Pengjie, QI Zhihui, ZHANG Haiyang, et al. The research of the fungi distribution and succession in rice stack of Liaoning province [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(5): 144-151
- [32] Marchiori A, Baumart J, Santos S. Immatures of chironomidae (Insecta-Diptera) under the action of pesti-cides in irrigated rice field [J]. Ecohydrology & Hydrobiology, 2012, 12(1): 43-52
- [33] Benjamin Y, Favre Bonte S, Josselin B, et al. Comparative genomics of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* strains with different antibiotic resistance profiles [J]. Genome Biology and Evolution, 2015, 7(9): 2484-2505
- [34] De Filippis F, La Stora A, Villani F, et al. Strain-level diversity analysis of *Pseudomonas fragi* after in situ pangenome reconstruction shows distinctive spoilage-associated metabolic traits clearly selected by different storage conditions [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2018, 85(1): 2212-18
- [35] Yurkov Andrey M, Kurtzman Cletus P. Three new species of Tremellomycetes isolated from maize and northern wild rice [J]. FEMS Yeast Research, 2019, 19(2)