

宁夏地区枸杞所携带真菌的分子鉴定

岳苑^{1,2}, 徐娟^{2,3}, 赵飞², 周梦诗⁴, 何利华², 张建中², 龚杰²

(1. 宁夏回族自治区食品检测研究院, 宁夏银川 750001) (2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206) (3. 武汉科技大学医学院公共卫生学院, 湖北武汉 430000) (4. 西安博睿康宁生物医学中心有限公司, 陕西西安 710000)

摘要: 宁夏是宁夏枸杞的主要种植地, 枸杞鲜果加工或干果储藏不当易发霉变质造成经济损失。本研究使用真菌培养及分子生物学技术分析引起宁夏枸杞干果霉变的主要真菌种类, 并探讨宁夏枸杞干果霉变可能造成的危害。从宁夏的五个村庄采集的枸杞霉变果实中分离培养真菌菌株, 将分离到的菌株提取 DNA, 利用生物条形码技术对致病真菌进行扩增和鉴定, 并使用最大似然法进行菌株系统发生分析。从宁夏枸杞分离出 45 株真菌, 经鉴定发现存在 10 个属的真菌, 分别为: 链格孢属 (*Alternaria* spp.)、镰刀菌属 (*Fusarium* spp.)、立枯丝核菌属 (*Rhizoctonia* spp.)、木霉属 (*Trichoderma* spp.)、*Filobasidium* 属 (*Filobasidium* spp.)、青霉属 (*Penicillium* spp.)、弯孢霉属 (*Curvularia* spp.)、毛霉属 (*Mucor* spp.)、黑曲霉菌 (*Aspergillus* spp.)、红酵母菌属 (*Rhodotorula* spp.)。导致宁夏枸杞干果霉变的真菌最常见的为链格孢属, 至少四种检出真菌能够产生真菌毒素, 可能会造成食品安全问题。因此, 需要加强和完善相关法律法规, 对宁夏枸杞中的真菌种类和数量进行限制。

关键词: 枸杞; 真菌; 真菌毒素; 分子鉴定

文章编号: 1673-9078(2019)010-102-109

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.015

Molecular Identification of Fungi Carried by *Lycium barbarum* from Ningxia

YUE Yuan^{1,2}, XU Juan^{2,3}, ZHAO Fei², ZHOU Meng-shi⁴, HE Li-hua², ZHANG Jian-zhong², GONG Jie²

(1. Ningxia Hui Autonomous Region Food Testing and Research Institute, Yinchuan 750001, China)

(2. Institute of Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Beijing 102206, China)

(3. School of Public Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430000, China)

(4. Xi'an Biorealcoming Biomedical Center co. LTD, Xi'an 710000, China)

Abstract: Ningxia is the main planting area of *Lycium barbarum*. Due to improper storage conditions, *L. barbarum* is very prone to mildew. It has caused significant economic losses. This study mainly analyzed the main fungal species causing mold and mildew of *L. barbarum* in Ningxia, and discussed the relevant consequences. The fungal strains were isolated from the mildewed fruits of *L. barbarum* collected from five villages in Ningxia. The strains were identified based on biobarcode technology and phylogenetic analysis was performed. The 45 isolated strains were identified as 10 genus, including: *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Filobasidium magnum*, *Penicillium chrysogenum*, *Curvularia spicifera*, *Mucor fragilis*, *Aspergillus niger*, *Rhodotorula mucilaginosa*. At least four fungi might produce mycotoxins, causing food safety problems. Therefore, the relevant laws and regulations should be revised to manage the quality of *L. barbarum*.

Key words: *Lyceum barbarum*; fungi; mycotoxin; molecular identification

收稿日期: 2019-04-02

基金项目: “十三五” 国家科技重大专项课题 (2018ZX10712-001); 传染病预防控制国家重点实验室重点项目 (2014SKL1D102); “西部之光” 人才培养计划

作者简介: 岳苑 (1982-), 女, 高级工程师, 研究方向: 食品中微生物检测和分子生物学检测

通讯作者: 龚杰 (1985-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 真菌学

枸杞, 别名枸杞果、白疙针、旁米布如, 属茄目茄科枸杞属 (*Lycium*), 是宁夏、甘肃、内蒙古、新疆、青海等干旱、半干旱地区广泛种植的一种沙生药用植物, 具有极强的耐旱、耐盐碱和耐贫瘠性^[1]。因含枸杞多糖、类胡萝卜素、黄酮、微量元素等物质, 宁夏枸杞是被载入新中国药典的枸杞品种, 中国国家地理标志产品^[2]。

枸杞鲜果采摘后,通过自然晾晒或烘干后制成干品。加工过程和(或)储藏方式不当,干果易发霉变质(见图1),造成巨大的经济损失。目前对于宁夏枸杞真菌污染现状的研究鲜有报道,同时 GB/T 18672-2014 枸杞国家标准^[3]和 DBS 64001-2017 枸杞地方标准^[4]均未对枸杞中的真菌含量有所限制,枸杞干果加工拣选阶段虽然会将肉眼可见霉变干果剔除,但残留真菌可能会造成二次污染,因此,枸杞的真菌污染是一个不可忽视的问题。

目前发现的产毒真菌主要有曲霉属(*Aspergillus* spp.),镰刀菌属(*Fusarium* spp.)和青霉属(*Penicillium* spp.)^[5]。真菌对食品的危害主要体现在真菌毒素污染,真菌毒素是真菌在其代谢过程中产生的次级代谢产物,对人、动物或植物有毒害作用,能在低浓度时干扰生物正常生理功能^[6],高浓度情况下会造成不可逆损伤,甚至致死。常见的真菌毒素可分为曲霉毒素,如黄曲霉毒素(Aflatoxins, AF)、赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA)等;青霉菌毒素,如展青霉素(Patulin, PAT)、桔青霉素(Citrinin, CIT)等;镰刀菌毒素,如脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)等及其他(如孢子毒等)几大类^[7]。人畜食用后不仅会导致肝毒、肾毒、神经毒等急慢性中毒,部分还具有致畸、致癌和致突变作用,威胁人类的食品安全和健康。基于以上原因,本文对宁夏枸杞干果所携带的真菌进行分子鉴定,并进行相关的系统发生分析,了解污染枸杞的主要真菌类型,有效提升生产、储存、加工等环节预防管控能力和效率,为进一步减少枸杞干果霉变,降低经济损失,提高宁夏枸杞的质量提供理论依据,并对今后相关法律、法规的制定提供数据支持。



图1 发霉变质的枸杞

Fig.1 Rotten *Lycium barbarum*

注:箭头标注的为发霉部位。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试枸杞采集、保存与运输:宁夏回族自治区某

市某村 1(XRLC)、宁夏回族自治区某市某村 2(LKZYC)、宁夏回族自治区某市某村 3(LKZC)、宁夏回族自治区某市某村 4(HLC)和宁夏回族自治区某市某村 5(TDC)等五个不同村落,采集方式为入村采集,每个村落采集 500 g~1000 g 霉变干果,分装于 2~3 个无菌采样袋中,密封。常温运输至实验室。避免运输过程中的二次污染。采集时间见表 1。

表 1 枸杞采样时间

Table 1 *Lycium barbarum* sampling time

采样地点	采样时间
宁夏回族自治区某市某村 1(XRLC)	2018.10.23
宁夏回族自治区某市某村 2(LKZYC)	2018.11.18
宁夏回族自治区某市某村 3(LKZC)	2018.11.18
宁夏回族自治区某市某村 4(HLC)	2018.11.18
宁夏回族自治区某市某村 5(TDC)	2019.01.06

1.2 主要试剂及仪器

马铃薯葡萄糖琼脂(Potato dextrose agar, PDA)培养基,北京陆桥技术有限责任公司;0.85%生理盐水,基因组 DNA 提取试剂盒(Qiagen,货号 51306)、PCR Mix (2×),Takara。

引物探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR 扩增仪,德国 Sensoquest(型号 LbaCylerStandarPlus);UVP 凝胶成像系统,美国 BIO-RAD 公司(型号 Gel Doc XR)。

1.3 真菌的分离纯化

方法一用接种针挑取霉变的枸杞果实,直接接种 PDA 培养基。方法二取 25 g 枸杞果实于均质袋中,加入 225 mL 0.85% 无菌生理盐水均质,吸取 100 μL 稀释液加入 PDA 平板,涂布,25 °C 培养。用两种分离纯化方法培养当菌落直径达到 1 cm 左右时,用接种针挑取不同菌丝分别植入新的 PDA 平皿内,继续培养。重复上述操作 2~3 次直至分离出单一菌落。

1.4 提取真菌基因组 DNA

分别挑取单一菌落,用珠磨法处理真菌后再用 QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen)试剂盒提取基因组 DNA:将菌落加入 600 μL 混有玻璃珠的裂解液中,球磨仪以频率 30 Hz 工作 15 min 进行真菌物理破壁,随后按照 Qiagen 提取试剂盒的操作说明提取真菌 DNA。

1.5 真菌核糖体转录间隔区(rDNA-ITS)序

列和核糖体大亚基序列 (LSU) 检测

分别利用真菌 rDNA-ITS 通用引物 ITS1(5'-TCCG TAGGTGAACCTGCGG-3')、ITS4 (5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3')^[8]和 LSU 引物 LROR(5'-ACCCGC TGAACCTTAAGC-3')、LR5 (5'-TC CTGAGGGAA ACTTCG-3')^[9]进行扩增。PCR 反应体系为 (30 μL): PCR Mix (2×) 15 μL, 引物(10 μmol/L)各 0.9 μL, 模板 DNA(100 mg/L)2 μL, ddH₂O 11.2 μL。ITS 序列 PCR 反应条件为: 95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 40 s, 34 个循环; 72 ℃终延伸 10 min。ISU 序列 PCR 反应条件为: 95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 30 s, 52 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 40 s, 34 个循环; 72 ℃终延伸 10 min。PCR 扩增产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.6 真菌的 ITS 序列和 ISU 序列分析及系统发育树的构建

分别采用真菌 rDNA-ITS 序列通用引物和 ISU 序列对腐烂枸杞干果中的真菌进行鉴定。将获得的 PCR 产物测序后,经过 BLAST 比对,选取相似性最高的菌种 rDNA-ITS 序列,采用最大似然法 (Miximum-Likelihood) 构建系统发育树,以 ISU 序列的结果进行验证。

2 结果与讨论

2.1 培养及分子鉴定结果

从五个地区的样品中共分离纯化出 45 株真菌,PCR 扩增产物测序后经 BLAST 比对,结果见表 2。其中 28 株为链格孢属 (*Alternaria* spp.), 5 株为镰刀菌属 (*Fusarium* spp.), 3 株为立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*), 3 株为木霉属 (*Trichoderma longibrachiatum*), 1 株为 *Filobasidium magnum*, 1 株为产黄青霉菌

(*Penicillium chrysogenum*), 1 株为穗状弯孢霉菌 (*Curvularia spicifera*), 1 株为毛霉菌属 (*Mucor fragilis*), 1 株为黑曲霉菌 (*Aspergillus niger*), 1 株为粘质红酵母菌 (*Rhodotorula mucilaginosa*) (Genbank 号见表 3)。具体菌株形态见图 2, 每个属取一种真菌做代表。

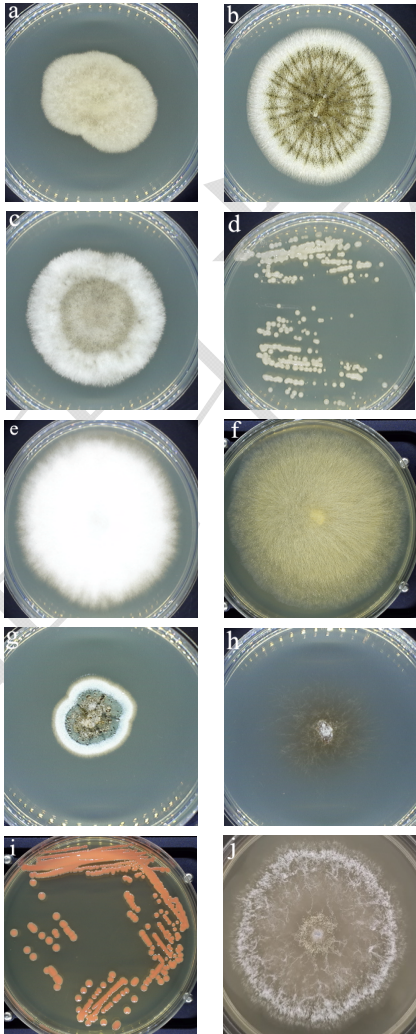


图 2 菌株形态

Fig.2 Morphology of strain

注: a: *Altetmaria* 属; b: *Aspengilus* 属; c: *Curvularia* 属; d: *Filobasidium* 属; e: *Fusarium* 属; f: *Mucor* 属; g: *Penicillium* 属; h: *Rhizochonia* 属; i: *Rhodotorula* 属; j: *Trichoderma* 属。

表 2 各地区真菌种类数量

Table 2 The number of fungal species in each region

fungal species	<i>Alternaria</i> sp	<i>Fusarium</i> sp	<i>Filobasidium magnum</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
XRLC	2	1	1		
LKZYC	6	1		1	
LKZC	5				3
HLC	4				

转下页

接上页

TDC	11	3		2	
Total	28	5	1	3	3
fungalspecies	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Curvularia spicifera</i>	<i>Mucor fragilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
XRLC					
LKZYC			1		
LKZC		1			
HLC					
TDC	1			1	1
Total	1	1	1	1	1

表3 新序列 Genbank 号

Table 3 New sequence Genbank

菌株编号	种属		Genbank 号
	ITS	LSU	
CDCF2510	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649953
CDCF2512	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649954
CDCF2514	<i>Fusarium incarnatum</i>	<i>Fusarium incarnatum</i>	MK649947
CDCF2522	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MK645994
CDCF2524	<i>Mucor fragilis</i>	<i>Mucor spp.</i>	MK646007
CDCF2526	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria spp.</i>	MK649955
CDCF2528	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649956
CDCF2530	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649958
CDCF2534	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649959
CDCF2536	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649960
CDCF2540	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649961
CDCF2542	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649962
CDCF2544	<i>Curvularia spicifera</i>	<i>Curvularia spicifera</i>	MK646022
CDCF2546	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649963
CDCF2548	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649964
CDCF2550	<i>Alternaria consortialis</i>	<i>Alternaria spp.</i>	MK649965
CDCF2552	<i>Alternaria spp.</i>	<i>Alternaria spp.</i>	MK649967
CDCF2554	<i>Alternaria consortialis</i>	<i>Alternaria consortialis</i>	MK649968
CDCF2558	<i>Filobasidium magnum</i>	<i>Filobasidium magnum</i>	MK646033
CDCF2560	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	MK646025
CDCF2562	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	MK646026
CDCF2564	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649969
CDCF2566	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	MK646027
CDCF2814	<i>Alternaria brassicae</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649970
CDCF2816	<i>Alternaria brassicae</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649971
CDCF2818	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649972
CDCF2820	<i>Alternaria brassicae</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649973
CDCF2822	<i>Alternaria brassicae</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649974
CDCF2826	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	MK646029

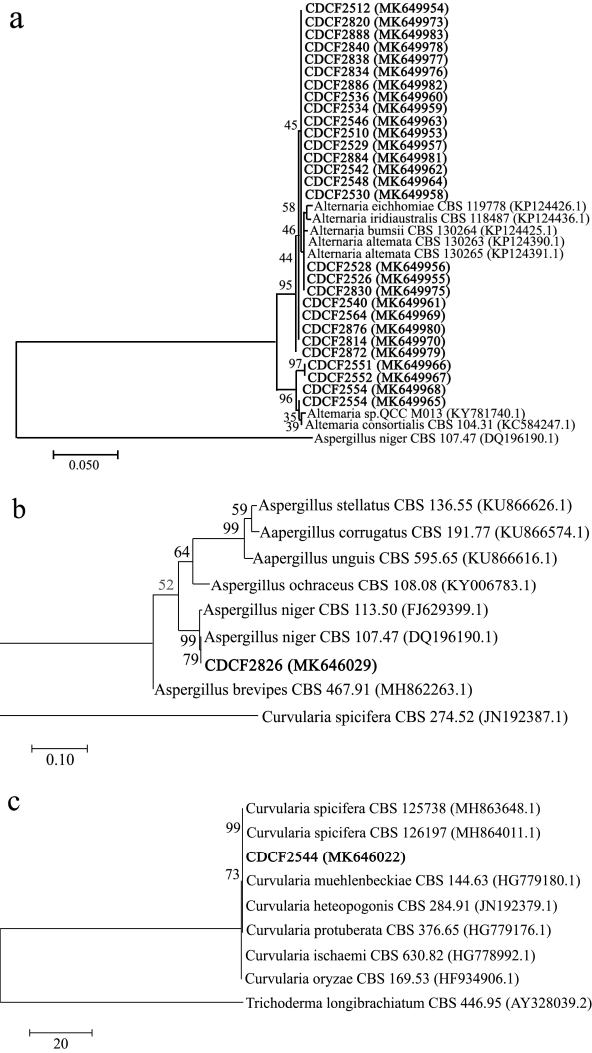
转下页

接上页

CDCF2830	<i>Alternaria brassicae</i>	<i>Alternaria brassicae</i>	MK649975
CDCF2834	<i>Alternaria compacta</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649976
CDCF2838	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649977
CDCF2840	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Alternaria alternata</i>	MK649978
CDCF2842	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma aethiopicum</i>	MK645995
CDCF2848	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MK646042
CDCF2856	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma aethiopicum</i>	MK645996
CDCF2870	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium incarnatum</i>	MK649949
CDCF2872	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649979
CDCF2874	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium incarnatum</i>	MK649950
CDCF2876	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649980
CDCF2880	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	MK649951
CDCF2884	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649981
CDCF2886	<i>Alternaria compacta</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649982
CDCF2888	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Alternaria alternata</i>	MK649983
CDCF2890	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	MK646040

2.2 系统发生分析结果

图 3 为采用最大似然法构建的系统发育树。图 3a 中有 24 株真菌与 *Alternaria alternata* 的亲缘关系最近,4 株真菌与 *Alternaria consorsialis* 的亲缘关系最近,将这 28 株真菌鉴定为链格孢属 (*Alternaria* spp.)。图 3b 中菌株 CDCF2826 与 *Aspergillus niger* 亲缘关系最近,鉴定为黑曲霉菌 (*Aspergillus niger*)。图 3c 中菌株 CDCF2544 与 *Curvularia spicifera* 亲缘关系最近,鉴定为穗状弯孢霉菌 (*Curvularia spicifera*)。图 3d 中菌株 CDCF2558 与 *Filobasidium magnum* 亲缘关系最近,鉴定为 *Filobasidium magnum*。图 3e 中菌株 4 株真菌菌株与 *Fusarium incarnatum* 亲缘关系最近, CDCF25-23 与 *Fusarium concentricum* 亲缘关系最近,将这五株菌鉴定为镰刀菌属 (*Fusarium* spp.)。图 3f 中菌株 CDCF2524 与 *Mucor fragilis* 亲缘关系最近,鉴定为毛霉菌 (*Mucor fragilis*)。图 3g 中菌株 CDCF2890 与 *Penicillium chrysogenum* 亲缘关系最近,鉴定为产黄青霉菌 (*Penicillium chrysogenum*)。图 3h 中有三株真菌与 *Rhizoctonia solani* 亲缘关系最近,鉴定为立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)。图 3i 中菌株 CDCF2848 与 *Rhodotorula mucilaginosa* 亲缘关系最近,鉴定为粘质红酵母菌 (*Rhodotorula mucilaginosa*)。图 3j 中有三株真菌与 *Trichoderma longibrachiatum* 亲缘关系最近,将这三株鉴定为木霉属 (*Trichoderma longibrachiatum*)。



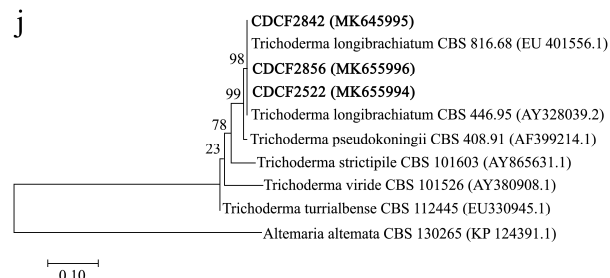
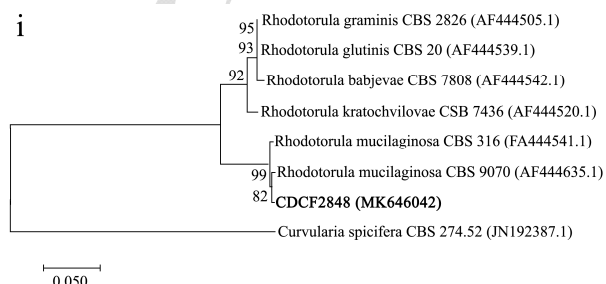
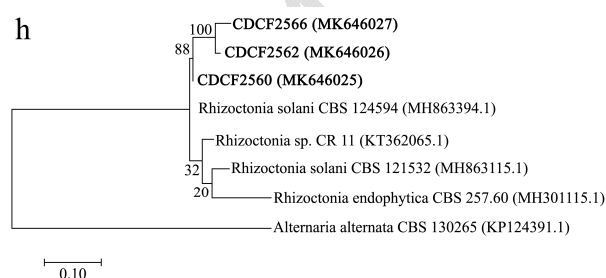
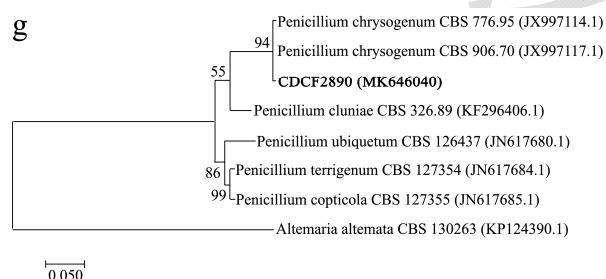
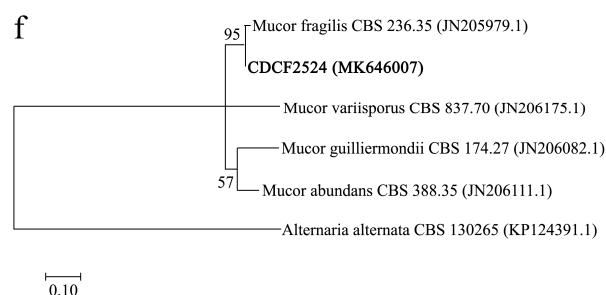
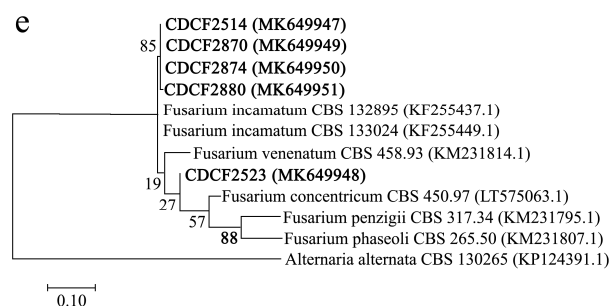
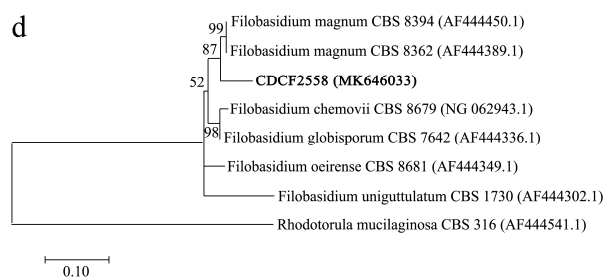


图3 真菌菌株的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of fungal strains

注: 字体加粗部分为本研究鉴定的菌株; a: *Alternaria* 属;

b: *Aspengilus* 属; c: *Curvularia* 属; d: *Filobasidium* 属; e: *Fusarium* 属; f: *Mucor* 属; g: *Penicillium* 属; h: *Rhizochonia* 属; i: *Rhodotorula* 属; j: *Trichoderma* 属。

2.3 讨论

本研究基于 rDNA 的 ITS, LSU 2 个序列对宁夏枸杞携带的真菌进行分子鉴定。ITS 和 LSU 序列常用来进行真菌鉴定, ITS 称为内转录间隔区, 是真菌 rRNA 基因非转录区的一部分^[10]。ITS 的真菌鉴定序列包括 ITS1, 5.8S 和 ITS2 区。由于 ITS 序列在关系密切的物种间的长度变化不大, 而且序列在进化过程中速率较快, 因此, ITS 序列经常用在属及属下水平做关于分类鉴定和系统发育研究^[11]。LSU 核糖体大亚基为核糖体大亚基序列, 是位于 28S 的 RNA 序列。nLSU 编码核糖体大亚基广泛用于真菌属以下组分之间和高级分类成员间关系的研究^[12]。表 3 中显示个别菌株用 ITS 和 LSU 序列分析会在属的水平上得到不同的分类结果, Schoch 等^[13]以多种真菌为对象对比了 ITS、LSU 和 SSU 在真菌分类中的区分效果, 结果证明 ITS 比其他基因片段有着更好的区分效果, 可以将不同真菌进行准确分类。因此本研究选择 ITS 序列的测序结果进行分类, 采用最大似然法构建系统发育树, 用 ISU 序列对 ITS 的分类结果进行验证。这样利用多基因分析及分子标记相结合的方法对供试菌株的遗传关系进行研究, 通过相互验证能够得到更为可靠的结论^[14]。

枸杞是宁夏的特色优势产业, 近三十年间, 宁夏枸杞子产量从 3000 t 增长至 20 多万 t^[15], 种植面积也逐年扩大, 但由于枸杞黑果病等病虫害的原因及晾晒、储运方式不当, 导致枸杞霉变, 给种植户造成较大经济损失, 形成了增产不增收的怪现象。从表 2 结果中可知, 从宁夏五个村庄采集的样品中共分离纯化出 45 株真菌, 其中 28 株为链格孢属 (*Alternaria* spp.), 说明链格孢属是宁夏枸杞所携带真菌的优势菌株, 这与祁鹤兴^[16]等人的研究结果一致。5 株镰刀菌属

(*Fusarium* spp.) 真菌主要从 1、2、5 号村庄的样品中分离出。3 株立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 均来自 3 号村庄, 3 株木霉属 (*Trichoderma longibrachiatum*) 真菌从 2、5 号村庄的样品中分离出。这些差异可能与不同村庄的生态环境有一定的关系。

链格孢霉属 (*Alternaria* spp.) 又称黑霉菌, 是一种常见半知菌类真菌, 种类繁多, 是引起各类果实采后发病的主要致病菌之一, 如黑果病、褐斑病等^[17], 其中黑果病是许多果实采后贮藏期间的典型病害。该真菌寄主范围广, 95% 以上的种能兼性寄生于植物上, 是许多有毒次生代谢物的生产者, 其中最突出的是聚乙烯醇衍生的交联苯醚 (AOH) 及其衍生物交联苯醚 (AME)^[18], 可引起多种植物尤其是农作物和经济作物发生病害并造成经济损失^[19], 有些链格孢菌甚至侵染人体和动物。链格孢属真菌可产生 70 多种有毒代谢产物-链格孢毒素, 这些毒素不仅是植物的主要致病因子^[20], 而且人和动物摄入被链格孢毒素污染的食品和饲料后还可导致急性或慢性中毒, 某些链格孢毒素还有致畸、致癌、致突变的作用^[21]。由于气候变化, 黑斑病的发病率在世界范围内呈上升趋势^[22]。在能引起黑斑病的真菌属中, 链格孢霉属是优势属之一, 常与霉菌毒素污染有关, 因此正确的识别是预防和控制该病的基础。

镰刀菌属 (*Fusarium* spp.) 又称镰孢霉属, 是真菌中较大的一个属, 广泛分布于自然界中, 在多种寄主中可引起叶片萎蔫、发育不良和发黄。镰刀菌属真菌产生的最重要的真菌毒素是毛霉菌和伏马菌素。伏马菌素可导致致命的牲畜疾病, 被认为是人类潜在的致癌真菌毒素^[23]。此外, 有些镰刀菌能产生植物刺激素 (赤霉素), 导致农作物严重的减产, 从而造成重大的经济损失, 有些镰刀菌可以产生真菌毒素-镰刀菌素, 对人和动物有强烈的毒性, 人畜食用后会造成食物中毒甚至死亡; 有些菌株可直接侵染人和动物, 造成严重的疾病^[24]。

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 是曲霉属真菌中的一个常见种, 广泛分布于世界各地的粮食、植物性产品和土壤中。在高温、高湿环境下, 黑曲霉容易大量生长繁殖产酶生热, 能引致水分较高的粮食霉变, 或生于多汁的果实上, 引起腐烂或软腐。

产黄青霉菌 (*Penicillium chrysogenum*) 是青霉属的真菌, 广泛分布于土壤、空气及腐败的有机材料等基物, 产生青霉素、多种酶类及有机酸, 可引起食物、谷物和果蔬的霉腐变质, 有的可产生致癌性的真菌毒素。

真菌毒素属于生物毒素中的一种, 也是食品安全

领域重点防治的对象。真菌毒素是由产毒真菌在适宜的环境条件下产生的有毒代谢产物, 其危害作用主要表现在对免疫系统的破坏以及强烈抑制免疫应答反应^[6]。由于产毒真菌多为腐败菌, 极易在农产品的生产、运输、加工、储藏和销售等过程中污染农产品, 但以现有的生产力条件, 尚无法完全杜绝真菌毒素进入人类食物链^[25], 只能采取有效的防控措施降低真菌毒素污染的可能性。本研究采集样品的时间距离鲜果成熟已有 4~7 个月, 仍然从干果中分离出产毒真菌, 加之近些年物流产业发展迅速, 可食用的枸杞干果从宁夏等气候干燥地区运输到炎热潮湿的地区, 有可能发生二次霉变的情况。因此通过建立标准化生产体系和科学的监管体系, 确保原料质量的安全, 并依据食品消费的风险机制, 严格制定真菌毒素的限量标准, 从源头和监管环节控制真菌毒素。

3 结论

导致宁夏枸杞干果霉变的真菌中, 至少四种真菌能够产生真菌毒素, 分别是: 链格孢霉属 (*Alternaria* spp.)、镰刀菌属 (*Fusarium* spp.)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、产黄青霉菌。这些真菌毒素会造成食品安全问题, 因此需要加强相关法律法规, 对宁夏枸杞中的真菌种类和数量进行限制, 完善枸杞的食品安全问题。

参考文献

- [1] 袁惠君, 贾鸿震, 李虎军, 等. 不同品种宁夏枸杞鲜果干制特征分析及评价[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(6): 200-204
YUAN Hui-jun, JIA Hong-zhen, LI Hu-jun, et al. Analysis and evaluation of dried fruit characteristics of different varieties of *Lycium barbarum* [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(6): 200-204
- [2] 国家质量监督检验检疫总局公告, 第 54 号(2004-05-18). http://www.aqsiq.gov.cn/xxgk_13386/jlgg_12538/zjgg/2004/200610/t20061027_315654.htm
Announcement of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine No. 54 (2004-05-18) http://www.aqsiq.gov.cn/xxgk_13386/jlgg_12538/zjgg/2004/200610/t20061027_315654.htm
- [3] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 枸杞: GB/T18672-2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, National Standardization Administration of China. Wolfberry: GB/T18672-2014 [S]. Beijing: China Standard Press, 2014

- [4] 宁夏回族自治区卫生和计划生育委员会.食品安全地方标准枸杞:DBS64001-2017[S]
Health and Family Planning Commission of Ningxia Hui Autonomous Region. Food Safety Local Standards Wolfberry: DBS64001-2017 [S]
- [5] 李蓉,黄莹偲,王勇.食品中真菌毒素检测技术的研究进展[J].中国卫生检验杂志,2015,25(18):3195-3198
LI Rong, HUANG Ying-si, WANG Yong. Advances in the detection of mycotoxins in food [J]. Chinese Journal of Health Inspection, 2015, 25(18): 3195-3198
- [6] 石庆楠.薏米霉变菌系鉴定及其毒素污染评价[D].贵阳:贵州大学,2017
SHI Qing-nan. Identification of *Mycobacterium coix* seed and evaluation of its toxin contamination [D]. Guiyang: Guizhou University, 2017.
- [7] 许艳丽,鲍蕾,静平,等.生物传感器在生物毒素检测中的应用进展[J].食品安全质量检测学报,2012,3(5):432-436
XU Yan-li, BAO Lei, JING Ping, et al. Advances in the application of biosensors in biotoxin detection [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2012, 3(5): 432-436
- [8] 关波,张璇,胡玉婵,等.新疆石河子地区甜樱桃采后腐烂致病真菌的分离鉴定[J].微生物学通报,2018,45(11):2480-2487
GUAN Bo, ZHANG Xuan, HU Yu-chan, et al. Isolation and identification of pathogenic fungi in rotten sweet cherry from Shihezi, Xinjiang [J]. Microbiology China, 2018, 45(11): 2480-2487
- [9] J B Stielow, C A. Lévesque, K A. Seifert, et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. [J]. Persoonia Molecular Phylogeny & Evolution of Fungi, 2015, 35: 242-263
- [10] Brans T D, Shefferson R P. Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: Recent advances and future directions [J]. Can J Bot, 2004, 82(8): 1122-1132
- [11] 渠文思,石家祺,石亚伟.基于 ITS 和 LSU 序列对一株野生鹅膏菌的分类鉴定[J].山西农业科学,2018,46(12):2073-2076
QU Wen-si, SHI Jia-qi, SHI Ya-wei. Classification and identification of a wild amanita strain based on ITS and LSU sequences [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2018, 46(12): 2073-2076
- [12] 高山.基于 nLSU rDNA 和 ITS 序列对侧耳属系统发育关系的研究[D].武汉:华中农业大学,2008
GAO Shan. Studies on phylogenetic relationship of pleurotus based on nLSU rDNA and ITS sequence [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008
- [13] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(16): 6241-6246
- [14] 谭秀梅,阿地力·沙塔尔,朴春根,等.无柄灵芝遗传多样性的 SRAP、ITS、TEF1- α 和 LSU 分析[J].微生物学通报,2016, 43(12): 2667-2677
TAN Xiu-mei, ADIL-Sattar, PIAO Chun-gen, et al. Genetic diversity of *Ganoderma resinaceum* by SRAP, ITS, TEF1- α and LSU markers [J]. Microbiology China, 2016, 43(12): 2667-2677
- [15] 秦垦,戴国礼.枸杞品种选育进展与展望[J].宁夏农林科技,2017,58(12):25-28,33
QIN Ken, DAI Guo-li. Progress and prospect of variety breeding of *Lycium barbarum* [J]. Ningxia Agricultural and Forestry Science and Technology, 2017, 58(12): 25-28, 33
- [16] 祁鹤兴,贾倩,高媛,等.宁夏枸杞果内生真菌多样性及其分布[J].北方园艺,2015,13:153-157
QI He-xing, JIA qian, GAO Yuan, et al. Diversity and distribution of endophytic fungi in *Lycium barbarum* [J]. The North Garden, 2015, 13: 153-157
- [17] 黄伟,冯作山,白羽嘉,等.采后果实链格孢属真菌病害防治方法研究进展[J].食品与机械,2016,32(3):247-251
HUANG Wei, FENG Zuo-shan, BAI Yu-jia, et al. Advances in the control methods of postharvest spora fungi diseases [J]. Food and Machinery, 2016, 32(3): 247-251
- [18] Maximilian W, Francesca G, Markus S H, et al. Alternariol as virulence and colonization factor of *Alternaria alternata* during plant infection [J]. Mol Microbiol, 2019 Apr, 4
- [19] 康子腾,姜黎明,罗义勇,等.植物病原链格孢属真菌的致病机制研究进展[J].生命科学,2013,25(9):908-914
KANG Zi-teng, JIANG Li-ming, LUO Yi-yong, et al. The research advances of mechanism of pathogenicity of *Alternaria* phytopathogenic fungi [J]. Life Science, 2013, 25(9): 908-914
- [20] 高芬,吴元华.链格孢属(*Alternaria*)真菌病害的生物防治研究进展[J].植物保护,2008,34(3):1-6
GAO Fen, WU Yuan-hua. Progresses in the biocontrol of plant diseases caused by *Alternaria* [J]. Plant Protection, 2008, 34(3): 1-6