

文章编号:1673-1689(2007)02-0076-04

## 大曲中可培养霉菌多样性的分子分析

惠丰立<sup>1</sup>, 褚学英<sup>1</sup>, 冯金荣<sup>1,2</sup>, 文祯中<sup>1</sup>

(1. 南阳师范学院生命科学与技术学院, 河南南阳 473061; 2. 河南师范大学生命科学院, 河南新乡 453002)

**摘要:** 从中温大曲中分离 98 株霉菌进行纯培养, 通过形态和培养特征初步分析后得到 6 个不同的类群, 从各类群中随机选取 1 个代表菌株进行 5.8S-ITS 序列分析和系统发育分析。结果表明, 分离的菌株分布在 *Monascus* 属、*Eurotium* 属、*Rhizopus* 属、*Cladosporium* 属、*Penicillium* 属、*Absidia* 属等 6 个已知真菌属, 揭示了中温大曲中霉菌的多样性。

**关键词:** 中温大曲; 霉菌; 5.8S-ITS; 多样性

**中图分类号:** Q 939; TS 262.4

**文献标识码:** A

### Molecular Analysis on Diversity of Culturable Mold Isolated from Medium Temperature Daqu

HUI Feng-li<sup>1</sup>, ZHU Xue-ying<sup>1</sup>, FENG Jin-rong<sup>1,2</sup>, Wen Zhen-zhong<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Nanyang Normal College, Nanyang 473061, China; 2. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

**Abstract:** In this manuscript, 98 mold strains were isolated from medium temperature Daqu using PDA culture medium. By analysis of the morphology and culture characteristic, the isolates were clustered into 6 genotypes, and the representatives of each genotype were randomly chosen for the determination 5.8S-ITS region sequences. The phylogenetic analysis indicated that all of the isolates were clustered into 6 group: *Monascus*, *Eurotium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Penicillium* and *Absidia*, respectively. These results show that the good diversity of mold in medium temperature Daqu.

**Key words:** medium temperature Daqu; mold; 5.8S-ITS; diversity

大曲是大曲酒生产的糖化剂和发酵剂, 含有多种微生物及其产生的多种酶类, 它构成了酿酒过程的内在动力<sup>[1,2]</sup>。由于大曲的生产是传统工艺, 自然培菌来网罗和富集环境中的微生物。因此, 大曲

中的微生物组成十分复杂。多年来, 人们致力于大曲中微生物多样性认识, 但由于受技术以及研究手段的限制, 基本上是以传统的形态和生理生化特征来进行分类和鉴定<sup>[1,3]</sup>。

收稿日期: 2006-07-30.

基金项目: 河南省自然科学基金项目(0411032300).

作者简介: 惠丰立(1965-), 男, 河南南阳人, 理学硕士, 教授. 主要从事微生物资源与生态学研究. Email: huifl@

126.com

以分子生物学方法为基础的微生物分子生态学,为人类认识自然界微生物群落组成的多样性提供了极大便利。5.8S-ITS 是介于 18S rDNA、5.8S rDNA 和 28S rDNA 之间的区域,该区域进化速度较编码区快。已有的研究表明,5.8S-ITS 在真菌的种间存在着丰富的变异,而种内不同菌株间却高度保守,可以为真菌的系统发育和分类鉴定提供丰富的遗传信息。目前 5.8S-ITS 序列已广泛应用于真菌分子分类学、分子系统及其多样性等方面的研究<sup>[4-6]</sup>。作者从大曲中进行霉菌的分离,在获得纯培养菌株的基础上,以 5.8S-ITS 序列分析为依据,对大曲中可培养霉菌的多样性进行分子分析,为揭示大曲中丰富的霉菌资源提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品、培养基与试剂

中温大曲由河南省卧龙酒厂提供;菌株分离培养基为 PDA 培养基;TaqDNA 聚合酶, dNTP,  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III marker, DL2000 marker 均购自鼎国公司;5.8S-ITS 扩增引物 ITS4 和 ITS5 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 菌株分离

将曲样在无菌操作的条件下粉碎(包括外、中、内 3 层的混合曲样),用稀释平板法分离大曲中的霉菌,挑取形态不同的菌落分别纯化并保存。

### 1.3 菌株的初步鉴定和归类

参照文献<sup>[7,8]</sup>,对分离菌株的产胞结构、分生孢子梗着生情况、孢子形态与颜色等特征进行观察,并对所有菌株进行初步分类,将形态和培养特征高度一致的归为同一类群。

### 1.4 DNA 的提取

各类群选取 1 个代表菌株,从生长约 4~5 d 的 PDA 平板上刮取代表菌株的菌丝体,用 CATB 法<sup>[9]</sup>提取 DNA,检测后置于一 20 °C 冰箱中备用。

### 1.5 PCR 扩增和测序

用真菌通用引物 ITS4(5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') 和 ITS5(5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3') PCR 扩增各类群代表菌株的 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 区域序列。PCR 反应体系(25  $\mu$ L):10 $\times$ PCR 缓冲液(含 20  $\mu$ mol/L 的 Mg<sup>2+</sup>)2.5  $\mu$ L,引物 ITS4 /ITS5(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L,模板 DNA(约 50 ng/mL)1.0  $\mu$ L, dNTP(10 mmol/L)0.5  $\mu$ L, Taq 酶(5 U/ $\mu$ L)0.2  $\mu$ L,双蒸水 18.8  $\mu$ L。PCR 扩增条件:94 °C 1 min;56 °C 1 min;72 °C 1.5 min,36 个循环。

所得 PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司纯化后,用 PE 公司 BigDye 循环测序试剂盒在 ABI 377 型 DNA 自动测序仪上进行直接双向测序,正反向测序引物分别为上述 ITS4 和 ITS5。

## 1.6 构建系统发育树

根据测序结果,利用 BLAST 搜索软件在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源序列搜索,以比较代表菌株与已知霉菌相应序列的相似程度。根据同源序列搜索结果,下载相关霉菌种的 5.8S-ITS 序列,与代表菌株的 5.8S-ITS 序列放在一起,用 CLUSTALX1.8 软件<sup>[10]</sup>进行多序列比对,并采用 Neighbor-joining 法<sup>[11]</sup>进行系统进化树构建和同源性比较。

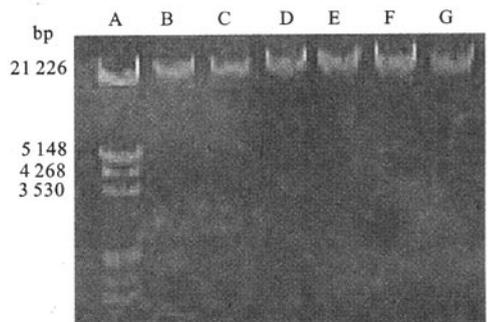
## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离和初步归类

采用稀释平板法从混合曲样中分离到 98 株大曲霉菌,它们的表型特征丰富多样。根据其产胞结构、分生孢子梗着生情况、孢子形态与颜色等,将分离到的菌株初步归为 6 个类群,分别编号为 DQY-8 到 DQY-13。

### 2.2 DNA 的提取和 PCR 扩增

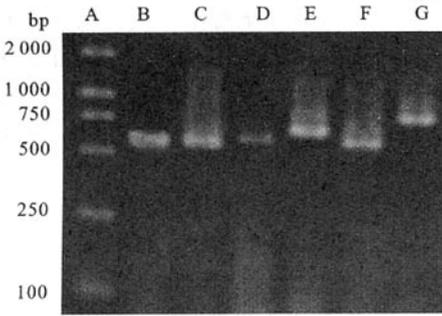
用 CATB 法提取了 6 个代表菌株的总 DNA, DNA 片段较为完整,大小主要集中在 21.2 kb 左右(见图 1)。以 ITS4 和 ITS5 为引物通过特异性 PCR 反应扩增得到 5.8 S-ITS 序列,扩增产生的 DNA 片段为单一条带,片段大小长度约为 600~800 bp,扩增产物无明显非特异扩增现象(见图 2)。



A.  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III; B. 菌株 DQY-8; C. 菌株 DQY-9; D. 菌株 DQY-10; E. 菌株 DQY-11; F. 菌株 DQY-12; G. 菌株 DQY-13

图 1 代表菌株总 DNA 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA of representative strains



A. DL2000 marker; B. 菌株 DQY-8; C. 菌株 DQY-9; D. 菌株 DQY-10; E. 菌株 DQY-11; F. 菌株 DQY-12; G. 菌株 DQY-13

图 2 代表菌株 5.8S-ITS 序列电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of ITS sequences of representative strains

2.3 5.8S-ITS 序列分析

测定 6 个代表菌株的 5.8S-ITS 序列, 将获得代表菌株的 5.8S-ITS 序列与 GenBank 数据库中已知相关菌株序列进行比较。采用 CLUSTALX1.8 软件进行多序列匹配排列, 根据 Neighbor-joining 法构建系统发育树(见图 3)。

在系统发育树中, 6 个代表菌株分别与 *Monascus* 属、*Eurotium* 属、*Rhizopus* 属、*Cladosporium* 属、*Penicillium* 属、*Absidia* 属等 6 个已知真菌属聚为一支, 相互之间的亲缘关系较远, 表明大曲中的霉菌有着很高的遗传多样性和种属多样性。然而, 不同的菌株却位于不同的亚分支上。菌株 DQY-8 与 *Monascus pilosus* 聚在进化树的同一个亚分支上, 其相似性为 100%, 这表明 DQY-8 属于 *Monascus pilosus* 相同种; DQY-11 与 *Rhizopus oryzae* 相似性为 100%, 并聚在进化树的同一个亚分支, 作者认为 DQY-11 应属于 *Rhizopus oryzae* 相同种; 菌株 DQY-12 与 *Penicillium expansum* 相似性为 99.2%, 聚在进化树的同一个亚分支, 根据这个结果, DQY-12 应属于 *Penicillium expansum* 相同种; 菌株 DQY-13 与 *Absidia corymbifera* 相似性为 100%, 聚在进化树的同一个亚分支, 根据这个结果, DQY-13 应属于 *Absidia corymbifera* 相同种; 菌株 DQY-9 和 DQY-10 与已知种的 5.8S-ITS 序列相似性都较高 (>99%), 分类地位须进一步研究确定。

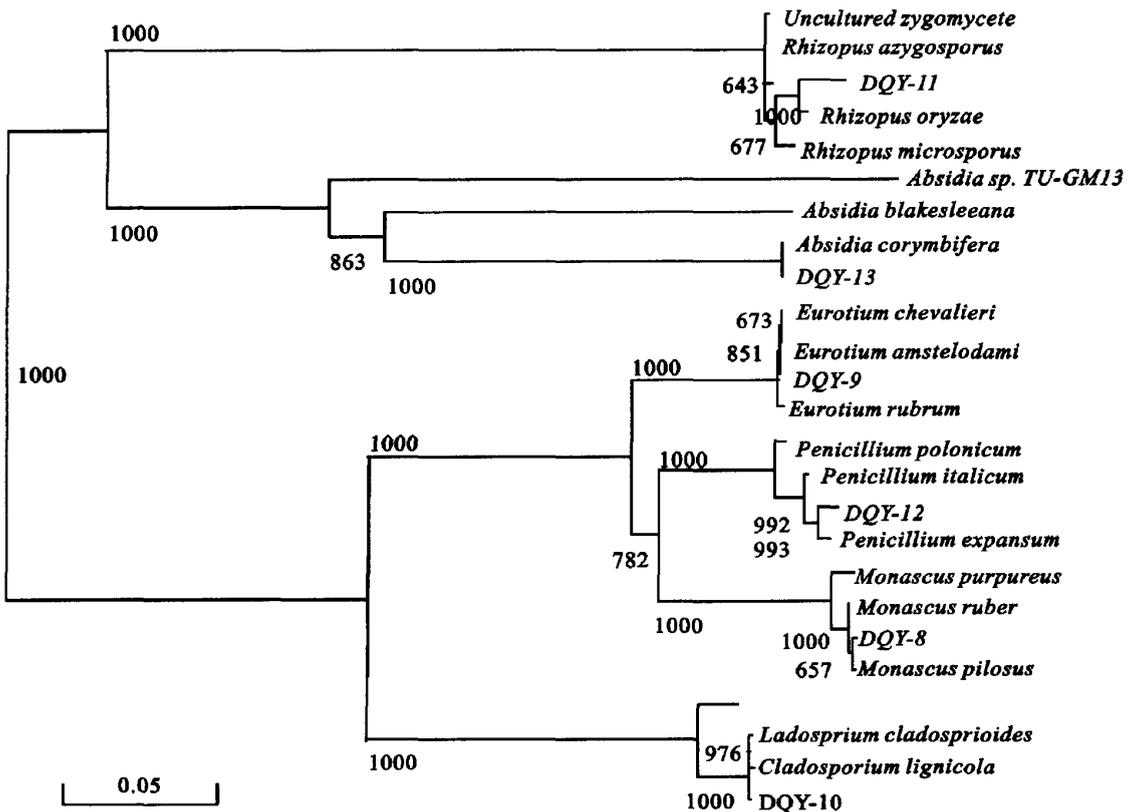


图 3 基于 5.8S-ITS 序列构建的系统进化树状图

Fig. 3 Phylogenetic tree showing the relationships among type strains and isolates from Daqu based on 5.8S-ITS sequence

### 3 结 论

通过对中温大曲中霉菌的表型及遗传多样性的研究,发现大曲中的霉菌具有丰富的多样性,主要分布在 *Monascus* 属、*Eurotium* 属、*Rhizopus* 属、*Cladosporium* 属、*Penicillium* 属、*Absidia* 属等 6

个已知真菌属。其中菌株 DQY-8、DQY-11、DQY-12 及 DQY-13,与它们最相近的已知种分别为 *Monascus pilosus*、*Rhizopus oryzae*、*Penicillium expansum*、*Absidia corymbifera*; 菌株 DQY-9 和 DQY-10 与多个已知种的 5.8S-ITS 序列相似性都较高,分类地位需进一步研究确定。

### 参考文献(References):

- [1] 姚万春,唐玉明,任道群,等. 泸州老窖国窖曲曲坯层次间微生物差异研究[J]. 酿酒,2005,32(5):35-36.  
YAO Wan-chun, TANG Yu-ming, REN Dao-qun, et al. Study on differences of microbes in the different layers of Guojiao Daqu[J]. *Liquor Making*,2005, 32(5):35-36. (in Chinese)
- [2] 孙家芳. 关于大曲中有效菌种的培养及应用的探索[J]. 酿酒, 2005,32(1):16-17.  
SUN Jia-fang. Application and cultivation of effective microzyme in Daqu[J]. *Liquor Making*,2005,32(1):16-17. (in Chinese)
- [3] 施安辉,关纪奎,张文璞,等. 徐坊大曲的微生物区系及其优势菌的鉴定[J]. 酿酒科技,2001,(6):26-28. (in Chinese)  
SHI An-hui, GUAN Ji-kui, ZHANG Wen-pu, et al. Analysis of microbial species in Xufang Daqu and determination of the dominant microbes[J]. *Liquor-making Science & Technology*, 2001,(6):26-28.
- [4] Horton T R, Bruns T D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: Peeking into the black-box[J]. *Molecular Ecology*,2001,10:1855-1871.
- [5] Viaud M, Pasquier A, Brygoo Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS[J]. *Mycol Res*,2000,104(9):1027-1032.
- [6] 马万里. 土壤微生物多样性研究的新方法[J]. 土壤学报,2004,41(4):103-107.  
MA Wan-li. A new method for research on soil microbial diversity[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004,41(4):103-107. (in Chinese)
- [7] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:232-278.
- [8] 中国科学院微生物所. 常见与常用真菌[M]. 北京:科学出版社,1973:1-253.
- [9] White T J, Bruns T D, Lee S, et al. PCR Protocols; a Guide to Methods and Applications[M]. New York: Academic Press, 1990:315-322.
- [10] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic Acid Res*,1994,22:4673-4680.
- [11] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. *Mol Bio Evol*, 1987,4:406-425.

(责任编辑:李春丽)