



•研究报告•

我国黄曲霉遗传多样性与产毒特性

余仲东¹ 余知和² 金世宇³ 王 龙^{4*}¹ (西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌 712100)² (长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025)³ (北京市京西林场, 北京 102300)⁴ (中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: 黄曲霉(*Aspergillus flavus*)是一种广泛分布的腐生真菌, 是黄曲霉毒素B (aflatoxin B, AFB)和圆环偶氮酸(cyclopiazonic acid, CPA)的主要产生菌, 也是动植物的条件致病菌。全球的玉米、花生和棉籽均不同程度地遭到黄曲霉及其毒素的污染。黄曲霉菌株间在形态学、遗传学和产毒特性上变异较大, 且其居群遗传结构也尚不明确。为了揭示黄曲霉居群遗传结构及其产毒特性的规律, 本研究选取了从我国26省区(包括大小兴安岭)不同环境中分离的黄曲霉88株, 结合模式菌株和国际权威菌株9株, 基于钙调蛋白基因(*CaM*)和β-微管蛋白基因(*benA*)进行多基因序列分型(multi-locus sequence typing, MLST), 使用MEGA 6.0和Structure 2.3.4软件进行系统发育学分析和居群结构推导, 并结合菌株的产毒特性(AFB和CPA)进行比较分析。结果显示本研究的97株黄曲霉可分为3个居群, 即黄曲霉居群I、黄曲霉居群II和米曲霉居群, 该97株黄曲霉共有17个序列型(sequence type, ST), 其中我国的88株菌分布于15个序列型。米曲霉居群均不产AFB, 黄曲霉居群I和II的菌株绝大多数都产AFB和CPA, 其产毒特性只具有菌株特异性, 与居群和序列型无关。黄曲霉菌株产毒特性与地理分布或农作物类型间存在一定关系。我国东北玉米产区、西北干旱棉花产区和南方花生产区的黄曲霉居群I和II菌株均产AFB和CPA, 我国青海可可西里和四川阿坝地区的黄曲霉仅产CPA而不产AFB, 不产AFB的米曲霉居群大部分来自我国气候和地理环境多样的华北地区, 该地区也是我国农村传统酿造黄豆酱的地区。

关键词: 多样性; 遗传标记; 真菌毒素; 直源基因; 种系学

Genetic diversity and toxin-producing characters of *Aspergillus flavus* from China

Zhongdong Yu¹, Zhihe Yu², Shiyu Jin³, Long Wang^{4*}¹ College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100² College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025³ Beijing Jingxi Forest Farm, Mentougou, Beijing 102300⁴ State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101

Abstract: *Aspergillus flavus* is commonly regarded as a kind of saprophytic fungi with a wide distribution. It is the major aflatoxin B (AFB) and cyclopiazonic acid (CPA) producing species, as well as a pathogen to humans and animals. In the world, huge amounts of corns, peanuts and cotton seeds are vulnerable to be contaminated by *A. flavus* and aflatoxin each year. There is much variance in morphological, genetic and toxin-producing characters among isolates of *A. flavus*, resulting in its ambiguous population structure. In this paper, we analyzed 88 isolates of *A. flavus* from different environments of 26 provinces (including the Greater and Lesser Khinggan Mountains) in China, as well as nine ex-types and authentic strains based on *CaM* and *benA* sequences to infer their sequence types (STs) using multi-locus sequence typing (MLST), and their phylogenetic relationships and population structures employing MEGA 6.0 and Structure 2.3.4 softwares, together with their toxin-producing features (AFB and CPA). Our results showed that the 88

收稿日期: 2019-02-14; 接受日期: 2019-05-15

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(2014FY210400)、科技部重点研发计划(2017YFD0600103-4-2)、国家自然科学基金(31270539; 31750001)和中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDY-SSW-SMC029)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: wl_dgk@sina.com

Chinese isolates and nine ex-type and authentic strains were distributed in three populations, i.e. *A. flavus* population I, *A. flavus* population II and population *A. oryzae*. There were 17 STs among the 97 isolates, among which the 88 strains from China were distributed in 15 STs. All isolates of population *A. oryzae* did not produce AFB, but most isolates of the *A. flavus* populations I and II produced AFB and CPA. The toxin-producing features were strain-specific, but not correlated to sequence types or populations. Some correlations between toxin-producing characters and geographical environments or crop types were recognized. The isolates of *A. flavus* populations I and II from the northeast areas planting corns, the arid northwest planting cottons and the south areas growing peanuts all produced AFB and CPA. The isolates from Hoh Xil of Qinghai and Aba of Sichuan did not produce AFB, though with the production of CPA. The isolates of *A. oryzae* population without AFB production were almost from North China with diverse climates and geographical environments, where the traditional Chinese soybean paste is made in the rural areas.

Key words: diversity; genetic markers; mycotoxins; orthologous genes; phylogenetics

黄曲霉(*Aspergillus flavus*)作为一种腐生菌广泛分布于自然界的土壤、空气、水体和人类活动场所。该菌同时也是一种植物机会病原菌,严重影响农作物产量和质量(Horn, 2003)。另外,有些黄曲霉菌株还是人类和多种动物的机会病原菌,约有15%的人类曲霉病(aspergillosis)由黄曲霉引起(Hedayati et al, 2007; Krishnan et al, 2009)。更具危害性的是它还产生强致癌剂黄曲霉毒素B (aflatoxin B, AFB),严重威胁着世界粮食和饲料的安全。另外AFB可以在哺乳动物体内被羟基化分泌到乳汁当中称为AFM (aflatoxin M),严重威胁着哺乳动物和人类的健康(CAST, 2003)。

黄曲霉在分类学上属于真菌界子囊菌门散囊菌纲散囊菌目曲霉科曲霉属(*Aspergillus*)黄曲组(Section *Flavi*)。典型黄曲霉的分类学性状是在25–37 °C时生长迅速,产生大量黄绿色分生孢;分生孢子形状多为球形和近球形,直径3.0–6.0 μm,表面带刺;通常产生深棕色至黑色菌核,直径通常400–800 μm,有些菌株的菌核小于350 μm,通常产生真菌毒素AFB和圆弧偶氮酸(cyclopiazonic acid, CPA),有极少菌株还产生黄曲霉毒素G (aflatoxin G, AFG) (Frisvad et al, 2019)。其菌株在菌核的产生与否、菌核大小和产毒与否及毒素种类上差别很大(Raper & Fennell, 1965)。Saito和Tsuruta (1993)在泰国发现了一些“不典型”的“黄曲霉”菌株,这些菌株产生的菌核直径小于400 μm,产生毒素AFB和CPA。这些“不典型”菌株被定为黄曲霉小核变种(*A. flavus* var. *parvisclerotigenus* Mich. Saito and Tsuruta)。Frisvad等(2005)在尼日利亚也发现了该类型菌株,他们根据形态学、产毒特性和rDNA

ITS1-5.8S-ITS2序列将其提升为独立的种,即小核曲霉(*A. parvisclerotigenus* (Mich. Saito and Tsuruta) Frisvad and Samson)。但是他们选定的模式菌株不是在泰国的模式菌株*A. flavus* var. *parvisclerotigenus* CBS 121.62,因此*A. parvisclerotigenus*为不合法名称。Frisvad等(2019)的研究认为*A. flavus* var. *parvisclerotigenus*应是*A. flavus*的一些产小核的特殊菌株,而分离自尼日利亚的产小核及AFB和AFG的菌株则属于一个新种,即黄毒曲霉(*A. aflatoxiformans* Frisvad, Ezekiel, Samson & Houbaken)。Cotty (1989)在美国发现了另外一些“不典型”的“黄曲霉”小核菌株,将其称为S型菌株,而将产大核的“典型”菌株称为L型菌株。前者产毒能力强,后者产毒能力较弱或不产毒。S型菌株又包括2种类型:第一类型菌株只产生AFB和CPA,不产生AFG,因此该类菌株应属于*A. flavus*;第二类菌株除了产生AFB、AFG和CPA,还产生大量的parasiticolides,而*A. flavus*和*A. aflatoxiformans*不产生该种物质,因此该类菌株很可能代表另外一个隐存种(cryptic species)。Geiser等(2000)根据3个基因*amdS*、*omt12*和*trpC13*片段序列(其中*omt12*是非直系同源基因(non-orthologous gene),属于AF生物合成基因簇)对来自美国、澳大利亚和尼日利亚的33株黄曲霉和3株米曲霉(*A. oryzae*)进行了系统发育学分析,将这些菌株分为2个群(Group I和Group II)。Group I包括产大核和小核菌株,均不产生AFG。该群又由3个亚群组成:IA包括产大核和小核菌株,多数产生AFB和CPA,有些不产生AFB;IB包括产大核菌株,均不产生AFB和AFG,但有些产生CPA,有些不产生CPA,还包括部分米曲霉菌株;IC包括产大核菌株,均不产生AFG,多数产生AFB

和CPA, 少数产AFB但不产CPA。Group II菌株产生AFB、AFG和CPA, 均由产小核菌株组成。Pildain等(2008)根据形态学、产毒特征、*beta*-tubulin (*benA*)和calmodulin (*CaM*)基因片段序列将Group II菌株定为一个新的隐存种, 即微核曲霉(*A. minisclerotigenes*)。至此, 黄曲霉广义种(*A. flavus sensu lato*)包括了3个种: 黄曲霉、黄毒曲霉和微核曲霉。而在东亚地区用于食品酿造的*A. oryzae*, Raper和Fennell (1965)的专著中将其作为*A. flavus*的一个近缘种, 后来的学者认为它是*A. flavus*的一个驯化类群, 应作为*A. flavus*的变种(Kurtzman et al, 1986)。Geiser等(2000)的研究显示*A. oryzae*属于*A. flavus*的一个群的亚群(见前述), 并建议保留*A. oryzae*的分类地位, Frisvad等(2019)的研究也沿袭了这种处理方法。

黄曲霉是一类适应能力很强的霉菌, 其生长温度范围相当广泛, 为10–48℃, 最适生长温度为33–37℃; 最适产毒温度也较宽, 为28–37℃, 而且在低水活度(water activity, *aw*)为0.73时也能正常生长和产毒(Pitt & Hocking, 2009)。气候和地理环境因素决定了其不同类群的分布。一般规律是在热带和高温干旱地区高产毒类群发生频率较高, 而在温带和较湿润的地区无毒类群占优势(Paterson & Lima, 2010)。比如在美国南部和阿根廷, 大部分为产毒较强的产小核的*A. flavus*, 其次为无毒群, 而且前者主要分布于高温干旱地区, 如亚利桑那沙漠(Cotty, 1997; Orum et al, 1997; Horn & Dörner, 1999; Barros et al, 2005)。*A. flavus*的产毒菌株通常分布于低纬度的热带及高温干旱地区, 但由于全球气候变化, 非季节性天气和极端天气如异常高温干旱天气逐渐增多, 受影响的地区和生物种类及自然生态系统在逐步扩大, 中高纬度地区和温带地区的植物、动物和人群正在受到高产毒黄曲霉的威胁(Hedayati et al, 2007; Krishnan et al, 2009; Paterson & Lima, 2010)。

我国地处北半球, 占国土总面积约70%的地区属于中温带、暖温带、亚热带, 这三个温度带集中了我国主要人口和粮食生产基地, 这些地区种植的正是黄曲霉类群容易侵染的作物, 如玉米、花生和棉籽。由于全球气候异常, 非季节性天气和极端天气增多, 我国大部分地区有可能受到高产毒黄曲霉类群的侵袭。有学者对我国部分地区的粮食中AFB污染情况进行了调查, 发现毒素污染在华南、华中和华东地区高, 华北较低, 东北和西北最低(高秀芬

等, 2011)。我国浙江省只发现了产大核和AFB的*A. flavus* (Wang et al, 1993), 但汪汉成等(2014)发现烟草种子携带高产毒的*A. minisclerotigenes*。《中国曲霉志》(齐祖同等, 1997)记载的黄曲霉大部分来自亚热带地区。但是这些研究只是对我国部分省区的黄曲霉类群进行的调查, 而且有些研究中物种概念比较模糊。本研究系统调查了我国中温带、暖温带和亚热带以及青藏高原地区黄曲霉遗传多样性、产毒特征和地理环境分布, 进一步明确了黄曲霉的物质概念, 可为我国粮食安全的评估提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与菌株分离

土壤样品选择我国26省区的农田、荒野、林地、山地4种环境类型的土壤, 采集腐殖质–淋溶层土壤约20 g放入无菌自封塑料袋中。玉米、花生、棉籽等粮食样品到当地农户或粮食市场收集, 同样约20 g放入无菌自封塑料袋中。土壤样品分离采用Malloch (1981)的倍比稀释倾倒入皿法。在25–30℃培养到合适天数, 挑取单菌落接种于麦芽精(Malt Extract Agar, MEA)斜面, 25℃培养7 d后冷藏于4℃待鉴定(Pitt & Hocking, 2009)。粮食样品采用Andersen和Thrane (2006)的直接平皿法(direct plating), 挑选单菌落转接至MEA斜面, 25℃培养7 d后冷藏于4℃以待鉴定。

1.2 形态学鉴定

将菌株接种于MEA培养基, 于25℃培养7 d。进行培养性状和显微性状的观察, 按照Raper和Fennell (1965)、Frisvad等(2005)、Pildain等(2008)、Pitt和Hocking (2009)的方法鉴定到种。

1.3 AF和CPA的检测

在3 mL酵母精蔗糖(yeast extract sucrose, YES)液体培养基中接入约 10^6 个孢子, 每株菌3个重复分别于30℃、33℃、37℃倾斜45°角培养3 d。AFB和CPA的提取和检测参考Sepahvand等(2011)。

1.4 遗传多样性分析

所研究的黄曲霉菌株包括来自我国中温带、暖温带、亚热带和青藏高原气候区的26省区不同地理环境的具代表性的88株, 国际菌株包括模式和权威菌株9株, 包括CBS 100927^T (*A. flavus*的模式菌株)、CBS 100925^T (*A. oryzae*的模式菌株)、CBS 120.51^T (托姆曲霉*A. thomii*的模式菌株)、CBS 485.65^T (黄曲

霉柱头变种*A. flavus* var. *columnaris*的模式菌株)和基因组测序菌株NRRL 3357和RIB40, 还有越南的3.2789、日本的3.4408、美国的3.4410, 共97株, 以及黄曲霉4个近缘种的模式菌株, 即花生曲霉(*A. arachidicola* CBS 117610^T)、黄毒曲霉(*A. aflatoxi-*
formans CBS 143679^T)、*A. minisclerotigenes* CBS 115635^T、寄生曲霉(*A. parasiticus* CBS 100926^T), 还有1株分离自酱油的*A. parasiticus* 3.306。分子系统学分析以溜曲霉(*A. tamari*)的模式菌株CBS 104.13^T作为外群。共计103株(表1)。

表1 黄曲霉菌株、分离地和基物及产毒特性
Table 1 *Aspergillus flavus* strains, isolation places and toxin-production

菌株顺序号* Number	物种 Species	菌株 Strains	分离地和基物 Isolation places and substrates	产毒素 Toxin production	
				AFB	CPA
1	<i>A. flavus</i>	CBS 100927 ^T	南太平洋群岛; 赛璐玢 Cellophane; South Pacific Islands	—	+
2	<i>A. oryzae</i>	CBS 100925 ^T	日本大阪; 分离基物未知 Ex-type of <i>A. oryzae</i> , unknown source; Osaka, Japan	—	+
3	<i>A. thomii</i>	CBS 120.51 ^T	英国伦敦; 污染物 Ex-type of <i>A. thomii</i> , culture contaminant; London, UK	—	+
4	<i>A. flavus</i>	CYH2-2-1	河北石家庄; 空气 Air; Shijiazhuang, Hebei, China	+	+
5	<i>A. flavus</i>	3.4408	日本东京; 土壤 Soil; Tokyo, Japan	+	+
6	<i>A. flavus</i>	14527	西藏米林; 土壤 Soil; Milin, Tibet, China	+	+
7	<i>A. flavus</i>	13483	山西五台山; 土壤 Soil; Mt. Wutaishan, Shanxi, China	+	+
8	<i>A. flavus</i>	13868	内蒙古呼伦贝尔; 土壤 Soil; Hulun Buir, Inner Mongolia, China	+	+
9	<i>A. flavus</i>	13894	湖南益阳; 土壤 Soil; Yiyang, Hunan, China	+	+
10	<i>A. flavus</i>	13895	江西三清山; 土壤 Soil; Sanqingshan, Jiangxi, China	+	+
11	<i>A. flavus</i>	13918	江苏苏州; 土壤 Soil, Suzhou, Jiangsu, China	+	+
12	<i>A. flavus</i>	13952	甘肃兰州; 土壤 Soil; Lanzhou, Gansu, China	—	+
13	<i>A. flavus</i>	13961	宁夏罗山; 土壤 Soil; Luoshan, Ningxia, China	—	—
14	<i>A. flavus</i>	13962	宁夏灵武; 土壤 Soil; Lingwu, Ningxia, China	—	—
15	<i>A. flavus</i>	14099	山西吕梁; 土壤 Soil; Ivliang, Shanxi, China	+	+
16	<i>A. flavus</i>	14131	山西大同; 土壤 Soil; Datong, Shanxi, China	+	+
17	<i>A. flavus</i>	14151	河南洛阳; 土壤 Soil; Luoyang, Henan, China	—	—
18	<i>A. flavus</i>	14152	河南南阳; 土壤 Soil; Nanyang, Henan, China	—	—
19	<i>A. flavus</i>	14153	山东泰安 土壤 Soil; Tai'an, Shandong, China	—	—
20	<i>A. flavus</i>	14154	山东临沂; 土壤 Soil; Linyi, Shandong, China	—	—
21	<i>A. flavus</i>	14155	河北兴隆; 土壤 Soil; Xinglong, Hebei, China	—	—
22	<i>A. flavus</i>	14156	河北张家口; 土壤 Soil; Zhangjiakou, Hebei, China	—	—
23	<i>A. flavus</i>	14157	河北保定; 土壤 Soil; Baoding, Hebei, China	—	—
24	<i>A. flavus</i>	14159	河北衡水; 土壤 Soil; Hengshui, Hebei, China	—	—
25	<i>A. flavus</i>	14175	浙江乌镇; 土壤 Soil; Wuzhen, Zhejiang, China	+	+
26	<i>A. flavus</i>	14334	安徽巢湖; 荸荠 Water chestnut; Chaohu, Anhui, China	+	+
27	<i>A. flavus</i>	14353	新疆吐鲁番; 土壤 Soil; Turpan, Xinjiang, China	+	+
28	<i>A. flavus</i>	14355	新疆石河子; 土壤 Soil; Shihezi, Xinjiang, China	+	+
29	<i>A. flavus</i>	14356	新疆乌鲁木齐; 土壤 Soil; Urumqi, Xinjiang, China	+	+
30	<i>A. flavus</i>	14357	新疆伊犁; 土壤 Soil; Yili, Xinjiang, China	+	+
31	<i>A. flavus</i>	14358	陕西榆林; 土壤 Soil; Yulin, Shaanxi, China	+	+
32	<i>A. flavus</i>	14359	陕西汉中; 土壤 Soil; Hanzhong, Shaanxi, China	+	+
33	<i>A. flavus</i>	14373	陕西渭南; 土壤 Soil; Weinan, Shaanxi, China	+	+
34	<i>A. flavus</i>	14374	新疆吐鲁番; 土壤 Soil, Turpan, Xinjiang, China	+	+
35	<i>A. flavus</i>	23124	海南五指山; 土壤 Soil; Mt. Wuzhishan, Hainan, China	+	+

表 1 (续) Table 1 (continued)

菌株顺序号* Number	物种 Species	菌株 Strains	分离地和基物 Isolation places and substrates	产毒素 Toxin production	
				AFB	CPA
36	<i>A. flavus</i>	AB34	四川若尔盖; 土壤 Soil; Ruoergai Prairie, Sichuan, China	—	+
37	<i>A. flavus</i>	FJ17-2	福建宁德; 茶叶 Tea; Ningde, Fujian, China	+	+
38	<i>A. flavus</i>	HB4	湖北神农架; 土壤 Soil; Shennongjia, Hubei, China	+	+
39	<i>A. flavus</i>	HL53	黑龙江凉水; 土壤 Soil; Liangshui Nature Reserve, Heilongjiang, China	+	+
40	<i>A. flavus</i>	HL70	黑龙江乌伊岭; 土壤 Soil; Wuyiling, Heilongjiang, China	+	+
41	<i>A. flavus</i>	KK39	青海互助县; 土壤 Soil; Huzhu County, Qinghai, China	—	+
42	<i>A. flavus</i>	KK41	青海互助县; 土壤 Soil; Huzhu County, Qinghai, China	—	+
43	<i>A. flavus</i>	KK49	青海互助县; 土壤 Soil; Huzhu County, Qinghai, China	—	+
44	<i>A. flavus</i>	KK50	青海可可西里; 土壤 Soil; Hoh Xil, Qinghai, China	—	+
45	<i>A. flavus</i>	KK65	青海楚玛尔河; 土壤 Soil; Chumaer River, Qinghai, China	—	+
46	<i>A. flavus</i>	KK66	青海可可西里; 土壤 Soil; Hoh Xil, Qinghai, China	—	+
47	<i>A. flavus</i>	KK67	青海楚玛尔河; 土壤 Soil; Chumaer River, Qinghai, China	—	+
48	<i>A. flavus</i>	KK68	青海沱沱河; 土壤 Soil; Tuotuo River, Qinghai, China	—	+
49	<i>A. flavus</i>	KK69	青海沱沱河; 土壤 Soil; Tuotuo River, Qinghai, China	—	+
50	<i>A. flavus</i>	KK70	青海楚玛尔河; 土壤 Soil; Chumaer River, Qinghai, China	—	+
51	<i>A. flavus</i>	KK72	青海青海湖; 土壤 Soil; Qinghai Lake, Qinghai, China	+	+
52	<i>A. flavus</i>	KK73	青海青海湖; 土壤 Soil; Qinghai Lake, Qinghai, China	+	+
53	<i>A. flavus</i>	KK94	青海坎布拉; 土壤 Soil; Kanbula, Qinghai, China	+	+
54	<i>A. flavus</i>	KK102	青海坎布拉; 土壤 Soil; Kanbula, Qinghai, China	—	+
55	<i>A. flavus</i>	KK103	青海坎布拉; 土壤 Soil; Kanbula, Qinghai, China	—	+
56	<i>A. flavus</i>	KK104	青海坎布拉; 土壤 Soil; Kanbula, Qinghai, China	—	+
57	<i>A. flavus</i>	KK114	青海坎布拉; 土壤 Soil; Kanbula, Qinghai, China	—	+
58	<i>A. flavus</i>	XZ107	陕西南宫山; 植物叶 Plant leaves; Mt. Nangongshan, Shaanxi, China	+	+
59	<i>A. flavus</i>	XZ108	陕西通天河; 植物叶 Plant leaves; Tongtian River, Shaanxi, China	+	+
60	<i>A. flavus</i>	XZ109	陕西南宫山; 植物叶 Plant leaves; Mt. Nangongshan, Shaanxi, China	+	+
61	<i>A. flavus</i>	XZ112	陕西通天河; 植物叶 Plant leaves; Tongtian River, Shaanxi, China	+	+
62	<i>A. flavus</i>	YN23	云南玉溪; 烟叶 Tobacco leaves; Yuxi, Yunnan, China	—	+
63	<i>A. flavus</i>	YN35	云南玉溪; 烟叶 Tobacco leaves; Yuxi, Yunnan, China	+	+
64	<i>A. flavus</i>	YN48	云南玉溪; 烟叶 Tobacco leaves; Yuxi, Yunnan, China	+	+
65	<i>A. flavus</i>	YN49	云南玉溪; 烟叶 Tobacco leaves; Yuxi, Yunnan, China	+	+
66	<i>A. flavus</i>	YN51	云南玉溪; 烟叶 Tobacco leaves; Yuxi, Yunnan, China	+	+
67	<i>A. flavus</i>	NRRL 3357	美国; 霉花生 Moldy peanuts; USA	+	+
68	<i>A. oryzae</i>	RIB40	日本; 谷粒 Cereal grains; Japan	—	—
69	<i>A. flavus</i>	3.262	辽宁大连; 空气 Air; Dalian, Liaoning, China	—	—
70	<i>A. flavus</i>	3.267	辽宁大连; 土壤 Soil; Dalian, Liaoning, China	—	+
71	<i>A. flavus</i>	3.337	天津; 蚊香 Mosquito-repellent incense; Tianjin, China	—	+
72	<i>A. flavus</i>	3.417	天津; 酱曲 Soy sauce starter; Tianjin, China	—	+
73	<i>A. flavus</i>	3.870	天津; 酱曲 Soy sauce starter; Tianjin, China	+	+
74	<i>A. flavus</i>	3.881	上海; 小麦 Wheat; Shanghai, China	—	+
75	<i>A. flavus</i>	3.2146	北京; 大米 Rice; Beijing, China	+	+
76	<i>A. flavus</i>	3.2758	广东广州; 空气 Air; Guangzhou, Guangdong, China	—	+
77	<i>A. flavus</i>	3.2789	越南河内; 土壤 Soil; Hanoi, Vietnam	—	+
78	<i>A. flavus</i>	3.2823	安徽芜湖; 植物 Plants; Wuhu, Anhui, China	—	+

表 1 (续) Table 1 (continued)

菌株顺序号* Number	物种 Species	菌株 Strains	分离地和基物 Isolation places and substrates	产毒素 Toxin production	
				AFB	CPA
79	<i>A. flavus</i>	3.3554	北京; 空气 Air; Beijing, China	—	+
80	<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>	CBS 485.65 ^T	日本; 黄油 Ex-type of <i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i> , butter; Japan	—	+
81	<i>A. flavus</i>	3.4408-2	北京; 空气 Air; Beijing, China	+	+
82	<i>A. flavus</i>	3.4410	美国 ATCC 28539; USA	+	+
83	<i>A. flavus</i>	3.5211	北京 CICC 2348; Beijing, China	—	+
84	<i>A. flavus</i>	3.5278	四川德阳; 烂水果 Rotten fruit; Deyang, Sichuan, China	+	+
85	<i>A. flavus</i>	3.5283	四川成都; 土壤 Soil; Chengdu, Sichuan, China	+	+
86	<i>A. flavus</i>	3.5309	四川都江堰; 土壤 Soil; Dujiangyan, Sichuan, China	+	+
87	<i>A. flavus</i>	3.5329	贵州梵净山; 皮革 Leather; Mt. Fanjingshan, Guizhou, China	+	+
88	<i>A. flavus</i>	3.6153	山东泰安; 小麦 Wheat; Tai'an, Shandong, China	—	+
89	<i>A. flavus</i>	3.6304	广西宜山; 玉米 Corn; Yishan, Guangxi, China	—	+
90	<i>A. flavus</i>	3.6307	吉林珲春; 亚麻 Linen; Hunchun, Jilin, China	+	+
91	<i>A. flavus</i>	3.6311	广东广州; 空气 Air; Guangzhou, Guangdong, China	+	+
92	<i>A. flavus</i>	3.6422	河北小五台山; 松果 Pinecone; Mt. Small Wutaishan, Hebei, China	+	+
93	<i>A. flavus</i>	3.6428	云南大理; 霉纸 Mouldy paper; Dali, Yunnan, China	+	+
94	<i>A. flavus</i>	3.6431	云南大理; 玉米叶 Corn leaves; Dali, Yunnan, China	+	+
95	<i>A. flavus</i>	3.6434	云南思茅; 土壤 Soil; Simao, Yunnan, China	—	+
96	<i>A. flavus</i>	14160	河南信阳; 土壤 Soil; Xinyang, Henan, China	—	—
97	<i>A. flavus</i>	FJ17	福建宁德; 茶叶 Tea; Ningde, Fujian, China	+	+
	<i>A. arachidicola</i>	CBS 117610 ^T	阿根廷; 花生叶 <i>Arachis glabrata</i> leaves; Argentina		
	<i>A. minisclerotigenes</i>	CBS 115635 ^T	阿根廷; 花生 <i>Arachis hypogaea</i> seeds; Argentina		
	<i>A. parasiticus</i>	CBS 100926 ^T	美国夏威夷; 嗜桔粉蚧 <i>Pseudococcus calceolariae</i> ; Hawaii, USA		
		3.306	天津; 酱曲 Soy sauce starter; Tianjin, China		
	<i>A. aflatoxiformans</i>	CBS 143679 ^T	尼日利亚; 土壤 Soil; Nigeria		
	<i>A. tamarii</i>	CBS 104.13 ^T	分离地未知; 活性炭 Activated carbon; unknown country		

* 菌株顺序号与图3对应; AFB为黄曲霉毒素, CPA为圆弧偶氮酸
* The reference numbers and colours of words are in accordance with Fig. 3; AFB, Aflatoxin B; CPA, Cyclopiazonic acid

DNA提取、两个直源基因(orthologous genes)该调蛋白基因(calmodulin gene, *CaM*)和beta-微蛋白基因(beta-tubulin gene, *BenA*)的PCR引物及扩增方法分别参考Wang和Zhuang (2004), Wang (2012), Glass and Donaldson (1995)。PCR产物测序由生物技术公司完成。

数据处理: 核酸序列用Bioedit 7.0.9 (Hall, 1999)编辑校对, 校对好的*CaM*和*BenA*基因序列链接成1026 bp的序列。分子系统学分析: 上述103个菌株的*CaM*和*BenA*链接序列用软件MEGA 6.0 (Tamura et al, 2011)的MUSCLE功能做对位排列(alignment)后, 进行最大似然法(maximum likelihood, ML)分析(碱基替换模型为Kimura-2), 并进行1,000次bootstrap检验(图1)。居群结构推导: 将链接后的97株黄

曲霉的*CaM*和*BenA*基因序列使用Structure 2.3.4进行居群推导。在burn-in过程采用100,000次链重复, 然后进行100,000次Markov Chain Monte Carlo重复, 将推导居群数设为1–6, 最佳居群数目由Structure Harvester确定。

2 结果

2.1 黄曲霉物种界定

ML分析结果显示*A. oryzae*、*A. thomii*和*A. flavus* var. *columnaris*的模式菌株CBS 100925^T、CBS 120.51^T、CBS 485.65^T与*A. flavus*的模式菌株CBS 100927^T同在一个分支, bootstrap支持率为92%, 明显与其5个近缘种分开, 因此*A. oryzae*、*A. thomii*和*A. flavus* var. *columnaris*均应称为*A. flavus*。但由于

*A. oryzae*广泛应用于食品工业并被大众所接受,真菌分类学者建议保留该名称,在本研究中将其作为*A. flavus*的一个居群的名称(图1)。

2.2 黄曲霉居群的确定

Structure 2.3.4推导出的居群最佳数目为3个居

群,分别用红色、绿色和蓝色区分(图1, 3)。

表2、图1-3显示我国的88株黄曲霉和9株国际黄曲霉菌株可以划分为3个居群。

第一个居群共42株,该群菌株变异较小(图1, 3中以红色标记),只有4个序列型(sequence type,

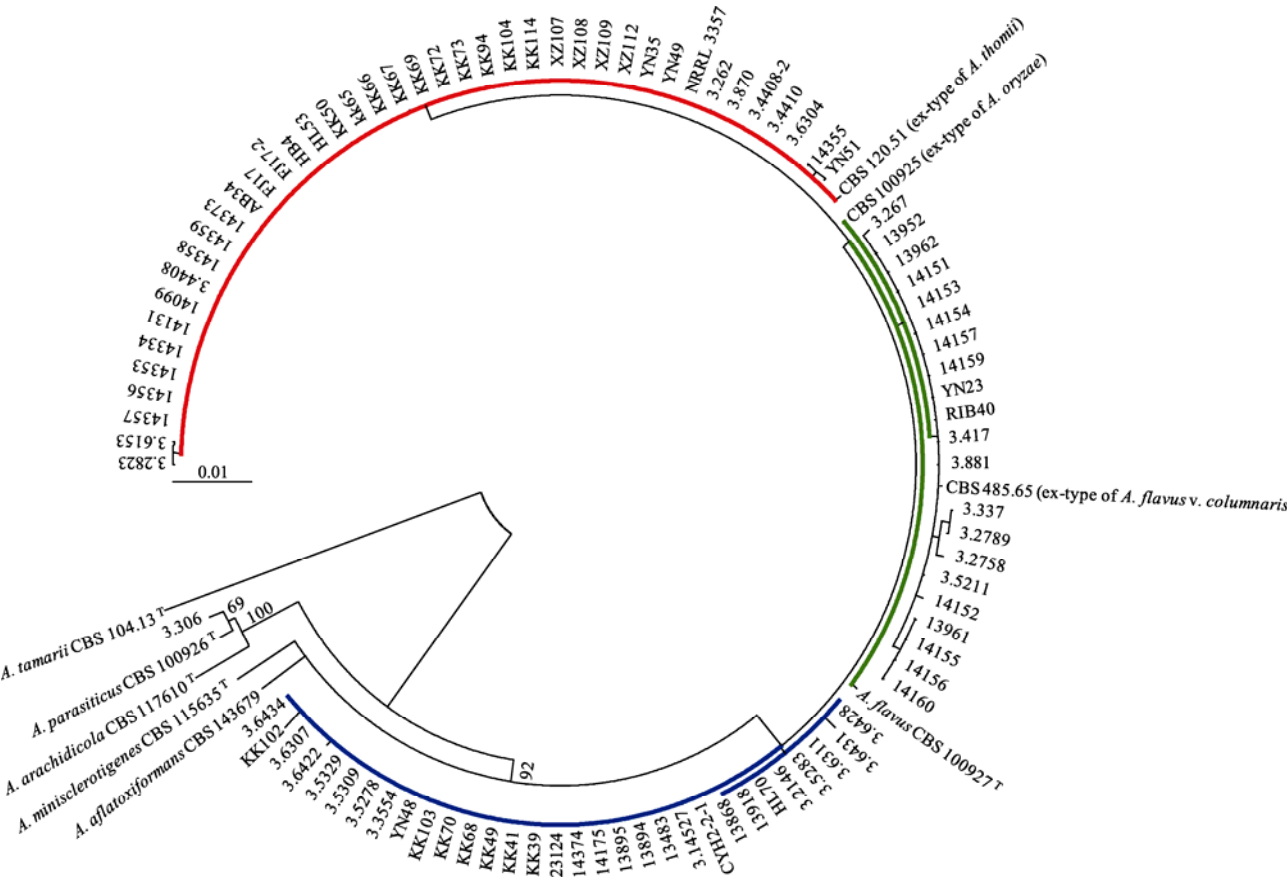


图1 97株黄曲霉及其4个近缘种的ML系统发育树。黄曲霉模式菌株CBS 100927^T、黄曲霉柱头变种模式菌株CBS 485.65^T、米曲霉模式菌株CBS 100925^T和托姆曲霉模式菌株CBS 120.51^T同在一个分支,支持率为92%,溜曲霉模式菌株CBS 104.13^T作为外群。红、绿、蓝颜色与图3对应。
Fig. 1 The maximum likelihood phylogram of 97 *Aspergillus flavus* strains and its four close-related species. The ex-type of *A. flavus* CBS 100927^T, ex-type of *A. flavus* var. *columnaris* CBS485.65^T, ex-type of *A. oryzae* CBS 100925^T, and ex-type of *A. thomii* CBS 120.51^T are in the same clade with a 92% support, with the ex-type of *A. tamarii* CBS 104.13^T as the outgroup. The red, green and blue colours are in accordance with Fig. 3.

表2 由Structure 2.3.4根据Delta K推导出的最佳居群数目K
Table 2 The best population number K inferred by Structure 2.3.4

K	Replicates	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
2	20	-252.900000	11.116323	—	—	—
3	20	-153.585000	0.665918	99.315000	115.770000	173.850119
4	20	-170.040000	4.371607	-16.455000	14.975000	3.425514
5	20	-171.520000	3.293790	-1.480000	16.860000	5.118723
6	20	-189.860000	14.895474	-18.340000	402.695000	27.034721
7	20	-610.895000	1,768.728466	-421.035000	779.785000	0.440873
8	20	-252.145000	53.166892	358.750000	—	—

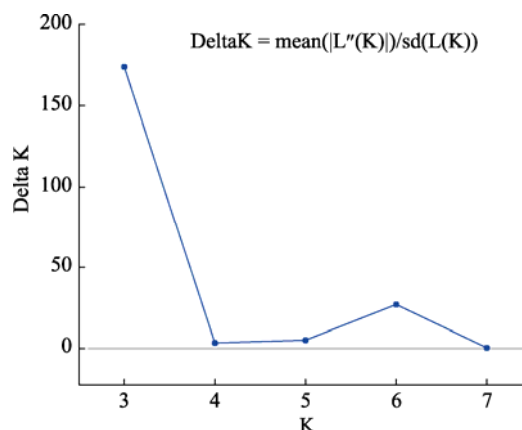


图2 Structure Harvester计算得到的最佳居群数目(delta K = 3为最佳)

Fig. 2 The best population numbers calculated by Structure Harvester (the best number is 3 for delta K)

ST)。第一个序列型有2个菌株: 3.2823和3.6153; 第二个序列型也有2个菌株: 14355和YN51; 第三个序列型只有1个菌株, 即*A. thomii*的模式菌株CBS 120.51^T; 第4个序列型包含剩余的37株菌, 以基因组测序菌株NRRL 3357为代表, 该群在本研究中称为黄曲霉居群I (*A. flavus* population I)。

第二个居群共23株(图1, 3中以绿色标记), 该群变异较大, 除了CBS 100925^T为1个序列型外, 我国菌株占6个序列型, 共有7个序列型: 第一个序列型只有米曲霉模式菌株CBS 100925^T; 第二个序列型只有菌株3.267; 第三个序列型包括3.337和3.2789; 第四个序列型只有3.2758; 第五个序列型只有14152; 第六个序列型有4株菌: 13961、14155、14156和14160; 第七个序列型包括了剩余的13株菌, 其中有基因组测序菌株RIB40和黄曲霉柱头变种的模

式菌株CBS 485.65, 用于工业生产酱油的菌株RIB40, 3.417, 3.5211以及分离自不同地区环境的10株菌在*CaM*和*BenA*序列上没有差别。米曲霉模式菌株CBS 100925^T并不属于这个居群的典型成员, 黄曲霉柱头变种的模式菌株CBS 485.65^T和基因组测序菌株RIB40是这个居群的典型代表, 该群在本研究中称为米曲霉居群(population *A. oryzae*)。

第三个居群共32株, 除*A. flavus*模式菌株CBS 100927^T外全部由我国菌株组成(表1, 图1, 3中以蓝色标记)。该群共有6个序列型: 第一个序列型只有*A. flavus*模式菌株CBS 100927^T; 第二个序列型只有3.6431; 第三个序列型有7个菌株: 3.6428、3.6311、3.5283、3.2146、HL70、13918和13868; 第四个序列型也只有1个菌株3.6422; 第五个序列型也只有1株菌KK102; 第六个序列型包含剩余的21株菌。该群在本研究中称为黄曲霉居群II (*A. flavus* population II)。*A. flavus*模式菌株CBS 100927^T的位置在图1, 3中发生矛盾, 在图1中它属于米曲霉居群, 而在图3中则属于黄曲霉居群II。由于它是黄曲霉的模式菌株, 根据Structure给出的结果, 我们将它放在黄曲霉居群II中。

2.3 菌株的产毒特性

总体上米曲霉居群都不产AFB, 而另外2个黄曲霉居群绝大多数产AFB和CPA, 但产毒特性只具有菌株特异性, 与居群和序列型无关。比如黄曲霉居群I的42株菌中分属于两个不同序列型的12株(3.2823、3.6153、3.6304、3.262、KK114、KK104、KK69、KK67、KK66、KK65、KK50、AB34)都不产AFB, 而剩余的30株菌虽然属于3个不同序列型,

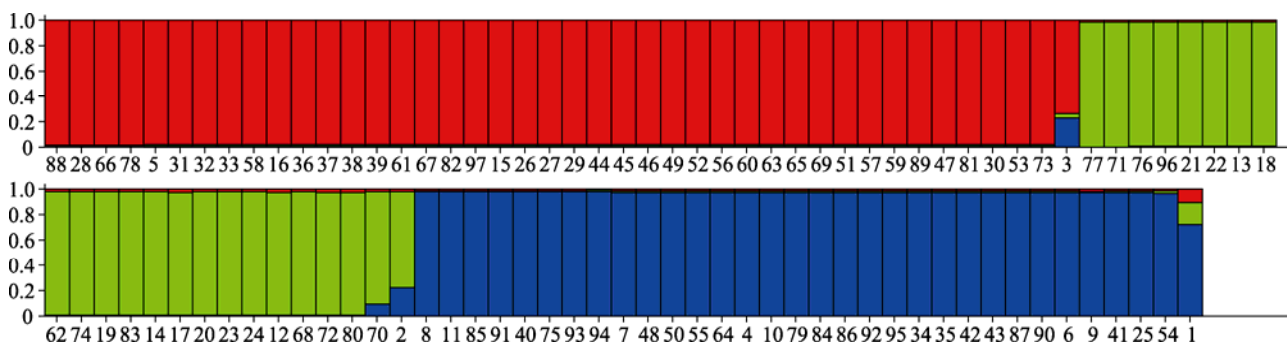


图3 97株黄曲霉由Structure Harvester计算得到3个居群。红色, 绿色和蓝色分别代表3个居群, 每一个颜色柱代表一个菌株, 菌株顺序号为颜色柱下面的数字, 与表1对应。

Fig. 3 The three populations of the 97 *Aspergillus flavus* isolates calculated by Structure Harvester. Red, green and blue colours stand for the three different populations, each column stands for each strain, and the number under each column is in accordance with those in Table 1.

但均产AFB; 该居群只有菌株3.262不产CPA, 其他41株菌分属四个序列型都产CPA。

黄曲霉居群II的32株菌共分6个序列型。其中属于两个不同序列型的10株不产AFB (CBS 100927^T、KK39、KK41、KK49、KK68、KK70、KK102、KK103、3.3554、3.6434), 其他3个不同序列型的21株菌均产AFB。另外, 该群菌株这6个序列型均产生CPA (表1)。

同属一个序列型的菌株, 有些产AFB和/或CPA, 有些则不产。例如黄曲霉居群I的42株菌中, 除3.2823、3.6153、14355、YN51、CBS 120.51^T外, 其余的37株同属一个序列型, 只有10株不产AFB(3.6304、3.262、KK114、KK104、KK69、KK67、KK66、KK65、KK50、AB34), 而剩余的27株均产AFB。另外, 该序列型只有菌株3.262不产CPA, 其他36株都产CPA。

米曲霉居群7个序列型的23株菌均不产生AFB, 而分别属于5个序列型的11株菌(CBS 100925^T、3.267、13952、YN23、3.417、3.881、CBS 485.65^T、3.337、3.2789、3.2758、3.5211)均产CPA。同属一个序列型的13株菌有7株既不产AFB也不产CPA(13962、14151、14153、14154、14157、14159、RIB40), 另外6株产CPA(13952、YN23、3.417、3.881、3.5211、CBS 485.65^T)。

2.4 产毒特性与地理分布

分离自我国东北的黑龙江凉水(HL53)和乌伊岭(HL70)以及内蒙古呼伦贝尔(13868)的菌株分别属于黄曲霉居群I和II, 均产AFB和CPA。分离自我国西北的陕西(XZ112、XZ109、XZ108、XZ107、14373、14359、14358)和新疆(14357、14356、14353、14355、14374)的菌株也都产AFB和CPA。但分离自我国可可西里和阿坝地区的菌株不产AFB, 如黄曲霉居群I的KK114、KK104、KK69、KK67、KK66、KK65、KK50、AB34以及居群II的KK39、KK41、KK49、KK68、KK70、KK103。另外, 不产AFB和CPA的米曲霉群菌株大部分分离自我国华北的河北、河南和山东地区, 如14151、14153、14154、14157、14159、14152、14155、14156、14160(表1)。

3 讨论

3.1 遗传标记的选择和我国黄曲霉的居群结构

居群(population)是物种演化(evolution)的最小单位, 只有共享衍生性状(shared derived characters)

才能反映种系发生学(phylogenetics)的信息。因此, 只有直源基因才能作为分子种系学研究的遗传标记。但要注意的是有些直源基因是多拷贝的, 如果在PCR扩增过程中将不同拷贝扩增出来用于种系学分析会得到错误的结论。所以理论上只有单拷贝直源基因(single copy orthologous genes)才适用于分子系统学研究。而次级代谢基因簇的基因属于非直源基因, 所以不适用于分子种系学。例如Geiser等(2000)根据3个基因(*amdS*, *omt12*, *trpC13*)片段序列(其中*omt12*是非直源基因, 属于AF生物合成基因簇)将33株黄曲霉和3株米曲霉分为2个群Group I和Group II。Group I包括产大核和小核菌株, 均不产生AFG。该群又分为3个亚群: IA菌株产大核和小核, 多数产生AFB和CPA, 有些不产AFB; IB菌株产大核, 均不产生AFB和AFG, 但有些产生CPA, 有些不产, 并包括部分米曲霉菌株; IC菌株产大核, 均不产AFG, 多数产AFB和CPA, 少数产AFB但不产CPA。Group II菌株产生AFB、AFG和CPA, 且产小核。

Varga等(2011)根据AF生物合成基因簇的3个基因: *aflR*、*norA*和*omtA*片段序列对*Aspergillus section Flavi* 22个种的系统发育学分析显示, *norA*和*omtA*均无法区分*A. flavus*和*A. minisclerotigenes*。其*omtA*的系统树显示3株*A. flavus*中的一株*A. flavus* SRRC 1007与*A. thomii*聚在一个分支, 另一株*A. flavus* NPL TX5-1与*A. minisclerotigenes*处于同一分支, 而第三株*A. flavus* CRA01-2B单独形成一个分支。在青霉与曲霉的分子系统学分析中广泛使用的3个直源基因(*rDNA ITS1-5.8S-ITS2*, *BenA* 和 *CaM*)中, *ITS1-5.8S-ITS2*在真菌中有200–300个拷贝, *beta-tubulin gene*有3个拷贝(*benA*, *benB*, *benC*), *calmodulin gene*只有一个拷贝(*CaM*)。本研究选择*CaM*和*benA*作为遗传标记用于黄曲霉的遗传多样性研究具有客观可靠性。

“黄曲霉”遗传多样性的研究由于使用了非直源基因以及模糊的物种概念导致其居群结构的划分相当混乱。Chang等(2006)根据AF生物合成基因簇的*omtA*片段序列(约594 bp)的33个单核苷酸多态(SNP)位点、产AFB特征及*norB-cypA*区缺失类型对29株“典型”黄曲霉和4株米曲霉进行系统发育学分析, 认为“典型”黄曲霉可分为3个分化支(clade), 米曲霉可分为2个分化支。Clade I由不产毒的大核菌株和米曲霉Clade 1菌株组成, *norB-cypA*区的缺失类型

均为I型缺失, 该支相当于Geiser等(2000)的IB群; Clade II包含产AFB的小核菌株和不产AFB的大核菌株, *norB-cypA*区的缺失类型为I型缺失, 该支相当于Geiser等(2000)的IA群; Clade III由产生和不产生AFB的大核菌株和米曲霉Clade 2菌株组成, *norB-cypA*区的缺失类型为I型或II型缺失, 其中米曲霉为I型缺失, 该支类似于Geiser等(2000)的IC群, 但Geiser等(2000)的IC群大多数产AFB。然而Chang和Eherlich (2010)根据CPA生物合成基因簇的*dmaT*单核苷酸多态性的分析并不支持米曲霉两个分支的划分, 其菌株与I型缺失的“典型”黄曲霉处于同一个分支。“典型”黄曲霉可分为三个群, 第一群: 产大核或小核, 多数产生AFB和CPA, 少数不产AFB, *norB-cypA*区为I型缺失。第二群: 产大核, 不产AFB但产生或不产生CPA, 包括部分*A. flavus*菌株, *norB-cypA*区为I型缺失。第三群: 产大核, 多数产生AFB和CPA, 还有一些菌株不产AFB, 包括部分*A. flavus*菌株; *norB-cypA*区为I型或II型缺失。Batista等(2008)用ISSR的方法将来自巴西的16株*A. flavus*分为2个群, 并认为其中一个群与地理来源具有较高的相关性。但基于ISSR对*A. flavus*进行居群划分的研究相对比较匮乏, 其客观性尚待讨论。菌核的产生与否及其大小, 毒素的产生与否及其种类, 黄曲霉毒素生物合成基因簇*norB-cypA*区的缺失类型以及次级代谢基因序列*omtA*、*norA*和*dmaT*均无法明确*A. flavus*居群的划分, 而且上述3个次级代谢基因在不同的研究中得出的结果不同。因此无法使用非直源基因用于居群结构的推导。

我们根据2个直源基因使用2种分析方法划分黄曲霉的3个居群基本上是一致的。Structure给出的结果比较明确, 而ML的结果缺乏统计学支持率, 但ML法能显示一些基因型上的差别。比如第一个居群的42株菌中可以分为4个序列型, 第一个序列型占优势, 共有37株, 以NRRL 3357为代表。第二个序列型由3.2823和3.6153组成, 这2株菌均不产生AFB。第三个序列型也包括2株菌, 即14355和YN51, 这2株菌均产生AFB。第四个序列型为CBS 120.51^T, 该菌株是*A. thomii*的模式菌株, Structure的结果也显示它与其他菌株有差异。

第二个居群, 即米曲霉居群的23株菌, 在遗传上变异较大, 共有7个序列型。Structure和ML在菌株CBS 100927^T的归群上有矛盾, Structure将其归在黄

曲霉居群II内, ML显示其不在任何一个群内, 但由于它是*A. flavus*的模式菌株, 我们根据Structure推导的结果把它归在黄曲霉居群II中。米曲霉居群遗传变异相当大, 可以推测这个居群遗传学上相对不稳定, 易于导致黄曲霉毒素合成酶某些基因缺失或突变从而失去AFB或AFG合成能力。例如Eherlich等(2004)和Chang等(2006)发现“典型”黄曲霉和米曲霉在AF生物合成基因簇的*norB-cypA*区具有2类缺失(deletion): 具有1.5 kb的缺失称为I型(Type I)缺失, 具有1.0 kb的缺失称为II型(Type II)缺失。这两类缺失均阻止一种细胞色素P450单加氧酶的生物合成, 而这种酶正是AFG合成所必需的, 因此“典型”黄曲霉和米曲霉不可能产生AFG (迄今只发现了2个韩国菌株能产生AFG (Frisvad et al, 2019))。

第三个居群共32株, 除了CBS 100927^T外全部由我国菌株组成, 但由于包括的国外菌株较少, 不能确定该居群是我国地方性的。从图1可以看出该居群遗传变异也比较大, 有6个序列型。其中8株菌(3.6428, 3.6431, 3.6311, 3.5283, 3.2146, HL70, 13918, 13868)单独组成一个分支, 明显与其他菌株区分。菌株的序列型和居群与地理分布无关, 例如分离自青海可可西里的菌株分属于黄曲霉居群I和II中, 米曲霉居群中的日本菌株RIB40和CBS 485.65^T与来自我国不同地域的菌株同属一个序列型(图1)。

3.2 黄曲霉产毒特性和地理分布

通常高温、干旱环境适合黄曲霉的生存和繁殖, 黄曲霉毒素合成基因能在此环境中被激活从而产生大量黄曲霉毒素(Medina et al, 2017)。另外, 作物类型对黄曲霉具有选择作用, 尤其是玉米、花生和棉花。在高温、干旱环境中这些农作物的免疫力降低从而易受黄曲霉的侵染(Horn et al, 1995; Cotty & Jaime-Garcia, 2007; Horn, 2003)。因此, 黄曲霉侵染及产毒特性与地理分布和农作物类型存在较为密切的关系。从我们的结果来看, 我国东北玉米产区的黑龙江和内蒙古菌株以及我国西北干旱棉花产区的陕西和新疆的黄曲霉菌株均产AFB和CPA, 我国南方种植花生的地区菌株也都产AFB和CPA。玉米、花生是各种动物(包括昆虫)喜欢的食物, 感染黄曲霉后动物拒绝采食, 可能提高了黄曲霉的生存繁殖几率。而我国青海可可西里和四川阿坝地区的黄曲霉虽然产CPA但多数菌株不产AFB。华北地区玉米、花生和棉花都广泛种植, 自然环境和农作物种

类差异较大,产毒和不产毒菌株普遍分布,生态多样性与遗传多样性相辅相成。但有意思的是,不产AFB和CPA的米曲霉居群大部分来自我国华北地区,如河北、河南和山东,这些地区是我国农村用传统方法酿造黄豆酱的地区。传统制酱采用蒸熟的黄豆自然晾晒进行空气接种的方式,空气中的米曲霉作为酱曲被我国劳动人民所利用,这也印证了一句谚语“一方水土养一方人”。

致谢: 感谢西北农林科技大学王博和长江大学余芸帮助野外考察采样和菌株分离。

参考文献

- Anderson B, Thrane U (2006) Food-borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins. In: Advances in Food Mycology (eds Hocking AD, Pitt JI, Samson RA, Thrane U), pp. 137–152. Springer, Boston.
- Barros G, Torres A, Chulze S (2005) *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85, 2349–2353.
- Batista PP, Santos JF, Oliveira NT, Pires APD, Motta CMS, Luna-Alves Lima EA (2008) Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. Genetics and Molecular Research, 7, 706–717.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology) (2003) Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems. Task Force Report No. 139, 13–85. CAST, Ames, IA.
- Chang PK, Ehrlich KC (2010) What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus flavus*? International Journal of Food Microbiology, 138, 189–199.
- Chang PK, Ehrlich KC, Hua SS (2006) Cladal relatedness among *Aspergillus flavus* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. International Journal of Food Microbiology, 108, 172–177.
- Cotty PJ (1997) Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. Mycological Research, 101, 698–704.
- Cotty PJ (1989) Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. Phytopathology, 79, 808–814.
- Cotty PJ, Jaime-Garcia R (2007) Influence of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. International Journal of Food Microbiology, 119, 109–115.
- Ehrlich KC, Chang P-K, Yu J, Cotty PJ (2004) Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. Applied and Environmental Microbiology, 70, 6518–6524.
- Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA (2005) Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, 28, 442–453.
- Frisvad JC, Hubka V, Ezekiel CN, Hong SB, Novakova A, Chen AJ, Arzanlou M, Larsen TO, Sklenar F, Mahakarnchanakul W, Samson RA, Houbraken J (2019) Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Studies in Mycology, 93, 1–63.
- Gao XF, Yin SA, Ji R (2011) Contamination of aflatoxins in peanuts from some regions in China. Chinese Journal of Public Health, 27, 541–542. (in Chinese with English abstract) [高秀芬, 荫士安, 计融 (2011) 中国部分地区花生中4种黄曲霉毒素污染调查. 中国公共卫生, 27, 541–542.]
- Geiser DM, Dorner JW, Horn BW, Taylor JW (2000) The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. Fungal Genetics and Biology, 31, 169–179.
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1323–1330.
- Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95–98.
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW (2007) *Aspergillus flavus*: Human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology, 153, 1677–1692.
- Horn BW, Greene RL, Dorner JW (1995) Effect of corn and peanut cultivation on soil populations of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in southwestern Georgia. Applied and Environmental Microbiology, 61, 2472–2475.
- Horn BW, Dorner JW (1999) Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. Applied and Environmental Microbiology, 65, 1444–1449.
- Horn BW (2003) Ecology and population biology of aflatoxinogenic fungi in soil. Journal of Toxicology-Toxin Reviews, 22, 351–379.
- Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH, (2009) *Aspergillus flavus*: An emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. Mycoses, 52, 206–222.
- Kurtzman CP, Smiley MJ, Robnett CJ, Wicklow DT (1986) DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* Group. Mycologi, 78, 955–959.
- Malloch D (1981) Moulds Their Isolation, Cultivation and Identification. University of Toronto Press, Toronto.
- Medina A, Gilbert MK, Mack BM, Brian GR, Rodríguez A, Bhatnagar D, Payne G, Magan N (2017) Interactions between water activity and temperature on the *Aspergillus flavus* transcriptome and aflatoxin B1 production. International

- Journal of Food Microbiology, 256, 36–44.
- Orum TV, Bigelow DM, Nelson MR, Howell DR, Cotty PJ (1997) Spatial and temporal patterns of *Aspergillus flavus* strain composition and propagule density in Yuma County, Arizona, soils. Plant Diseases, 81, 911–916.
- Paterson RRM, Lima N (2010) How will climate change affect mycotoxins in food? Food Research International, 43, 1902–1914.
- Pildain MB, Frisvad JC, Vaamonde G, Cabral D, Varga J, Samson RA (2008) Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 725–735.
- Pitt JI, Hocking AD (2009) Fungi and Food spoilage, 3rd edn. Springer-Science Media, London.
- Qi ZT, Kong HZ, Sun ZM (1997) Flora Fungorum Sinicorum Vol. 5. *Aspergillus et teleomorphi cognate*. Science Press, Beijing. (In Chinese) [齐祖同, 孔华忠, 孙曾美 (1997) 中国真菌志第五卷: 曲霉属及其相关有性型. 科学出版社, 北京.]
- Raper KB, Fennell DI (1965) The Genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Saito M, Tsuruta O (1993) A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology, 37, 31–36.
- Sepahvand A, Shams-Ghahfarokhi M, Allameh A, Jahanshiri Z, Jamali M, Razzaghi-Abyaneh M (2011) A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus flavus* from indoor and outdoor hospital environments. Folia Microbiologica, 56, 527–534.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 8, 2731–2739.
- Varga J, Frisvad JC, Samson RA (2011) Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. Studies in Mycology, 69, 57–80.
- Wang L, Zhuang WY (2004) Designing primer sets for amplification of partial calmodulin genes from penicillia. Mycosystema, 23, 466–473.
- Wang L (2012) Four new records of *Aspergillus* section *Usti* from Shandong Province, China. Mycotaxon, 120, 373–384.
- Wang ZG, Zhe T, Cheng SY, Cong LM (1993) Study of pectinase and sclerotium producing abilities of two kinds of *Aspergillus flavus* isolated from Zhejiang. Mycopathologia, 121, 163–168.
- Wang HC, Huang YC, Wang J, Wang MS, Shang SH, Ye DY, Long MJ (2014) Fungi isolation and identification of tobacco seeds. Chinese Tobacco Science, 35(5), 84–88. (in Chinese with English abstract) [汪汉成, 黄艳飞, 王进, 王茂胜, 商胜华, 叶定勇, 龙明锦 (2014) 烟草种子携带病原真菌的分离与鉴定. 中国烟草科学, 35(5), 84–88.]

(责任编辑: 郭良栋 责任编辑: 时意专)