

研究报告

橘皮表面真菌群落结构多样性分析

张鑫 刘素娟 王智磊 王福 陈林 陈鸿平* 刘友平*

(成都中医药大学药学院 中药材质量标准化教育部重点实验室 中药资源系统研究与开发利用省部
共建国家重点实验室培育基地 四川 成都 611137)

摘要:【目的】研究鲜橘皮表面真菌群落结构多样性,为探讨橘皮经贮藏陈化为陈皮真菌群落的变化奠定基础。【方法】在广东、四川、广西、江西、重庆 5 个柑橘主产地采集橘栽培变种茶枝柑、大红袍等的鲜橘皮,在 Illumina HiSeq 平台上扩增橘皮表面真菌 ITS 区进行高通量测序,分析真菌物种注释及丰富度,并应用 α 与 β 多样性分析(Alpha & Beta diversity)对真菌群落结构组成进行分析。【结果】8 批橘皮样品的有效序列可分类至 35 个属,不同产地茶枝柑、大红袍等品种橘皮表面真菌群落由 7 类真菌群落组成,种类一致,其中担孢酵母属(*Erythrobasidium*)、青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、球腔菌属(*Mycosphaerella*)为最大相对丰度排名前 5 的属,首次在橘皮表面发现枝氯霉属和短梗霉属真菌。【结论】明确了橘皮表面真菌群落结构组成,为橘皮在贮藏过程中真菌群落变化与药材品质变化相关性研究奠定基础。

关键词: 橘皮, 真菌, 高通量, 真菌群落结构, 真菌多样性

Community structure analysis of fungi isolated from citrus surfaces

ZHANG Xin LIU Su-Juan WANG Zhi-Lei WANG Fu CHEN Lin

CHEN Hong-Ping* LIU You-Ping*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province—Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and MOST, Chengdu, Sichuan 611137, China)

Abstract: [Objective] To study the structural diversity of the fungal communities on the surface of fresh citrus peel, with an aim to establish foundation for exploring the changes of the fungal

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81072991); National Science Fund for Talent Training in Basic Science (No. J1310034); Application Foundation Project from Sichuan Province Science and Technology Department (No. 2015JY0012)

*Corresponding authors: Tel: 86-28-61800103

E-mail: Chen Hong-Ping: chen_hongping@126.com; Liu You-Ping: liuyouping@163.com

Received: June 15, 2016; **Accepted:** September 13, 2016; **Published online** (www.cnki.net): October 09, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81072991); 国家基础科学人才培养基金项目(No. J1310034); 四川省科技厅应用基础项目(No. 2015JY0012)

*通讯作者: Tel: 86-28-61800103

E-mail: 陈鸿平: chen_hongping@126.com; 刘友平: liuyouping@163.com

收稿日期: 2016-06-15; 接受日期: 2016-09-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-10-09

community when the citrus peel became the citri reticulatae pericarpium (CRP) during storage and aging. **[Methods]** The fresh citrus peel from the Citrus cultivar –*Citrus reticulata* ‘Chachi’ and *Citrus reticulata* ‘Dahongpao’ was collected from 5 main citrus origins, namely, Guangdong, Sichuan, Guangxi, Jiangxi, and Chongqing. The fungal internal transcribed spacer (ITS) domain on the citrus peel surface was amplified on the Illumina HiSeq platform for high-throughout sequencing for the first time, the species annotations and abundance of the fungi were analyzed, and the structural composition of the fungal communities was analyzed based on the analysis of Alpha & Beta diversity. **[Results]** The effective sequences of the 8 citrus peel samples could be classified into 35 genera. The fungal communities on the citrus peel surface of cultivars like ‘Chachi’ and ‘Dahongpao’ with various origins were consistently made up of 7 genera, among which, *Erythrobasidium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Mycosphaerella* were the top 5 genera in terms of the maximum relative abundance. In addition, it was the first time to discover *Aureobasidium* and *Ramichloridium* on citrus peel surface. **[Conclusion]** This research had determined the structural composition of the citrus peel surface fungal communities, which had established foundation for the correlation research on the fungal community changes and the quality changes of the crude medicine during the storage of citrus peel.

Keywords: Citrus peel, Fungi, High throughput, Fungal community structure, Fungal diversity

橘皮为芸香科植物橘(*Citrus reticulata* Blanco)及其栽培变种的成熟果皮,鲜橘皮经干燥、贮藏陈化后作为陈皮药用。陈皮始载于《神农本草经》,列为上品,具有理气健脾、燥湿化痰之功^[1],为大宗中药材。陈皮为中药“六陈”之一,传统中医理论认为陈皮“陈久者良”^[2-3],目前已有较多研究对这一说法进行科学验证,均证明久贮陈皮活性成分发生变化,但其科学内涵的研究有待深入。

本课题组前期提出陈皮表面微生物长期代谢产生成分变化的假设,报道了陈皮霉变可引起黄酮类成分增加^[4],通过反接试验筛选出主要引起黄酮类成分增加的真菌为黑曲霉,证实黑曲霉等真菌可引起陈皮中黄酮类成分的增加,首次将微生物与陈皮药材品质相结合证明在陈化过程中真菌参与了陈皮药材品质的变化,但鲜橘皮与陈化为陈皮后表面真菌群落结构的分析未见报道。因此本文在前文基础上首次研究了橘的果皮表面真菌群落的结构组成。既往基于纯培养对橘皮致病真菌与霉菌的分离鉴定和生物学特征上进行了研究^[5-7],但真菌种类繁多,且其生长、生理生化特征会随着环境的变化而不稳定,因此采用纯培养方式对真菌进行正确分类存在较大困难,难以明确整体真菌群落结构。

近年来,内转录间隔区(Internal transcribed

spacer, ITS)已被广泛应用于真菌分类鉴定中^[8-10],利用 HiSeq 平台对 ITS1 区进行测序,具有测序深度高、利于鉴定低丰度群落物种及费用低的特点^[11-12]。高通量测序不仅能获得样品中的微生物群落组成,还能将其相对含量进行数字化,为环境样品中微生物群落的多样性分析提供一种可靠有效的方法。目前高通量测序技术在土壤^[13-14]、人类皮肤^[15]、葡萄表面^[16]等样品中的微生物多样性分析得到广泛应用。微生物群落多样性研究主要的技术包括扩增子测序和宏基因组测序,扩增子测序主要通过特定长度的 PCR 产物进行测序分析,针对环境样本,ITS 扩增子测序是研究环境微生物多样性及群落组成差异的重要技术手段之一。因此本研究利用 ITS 扩增子测序技术对鲜橘皮进行表面真菌多样性和群落结构分析,旨在明确橘皮表面的优势、特有菌群,为进一步探讨真菌与陈皮药材品质间的相关性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品信息

在四川、广东、广西、江西、重庆 5 个柑橘主产地采集 8 批橘皮样品,采集后迅速保存于-80℃。样品均经成都中医药大学药学院中药鉴定教研室严铸云教授鉴定,鉴定结果见表 1。

表 1 样品采集信息表
Table 1 Samples information

编号 No.	品种名 Variety name	采样地点 Sampling sites	采样时间 Sampling time
WL	樟头红 <i>C. reticulata</i> Blanco cv. Zhangshuensis Hort.	江西省南昌市湾里区	2015.10.30
DY	大红袍 <i>C. reticulata</i> ‘Dahongpao’	四川省成都市大邑县	2015.11.14
PJDX	大红袍 <i>C. reticulata</i> ‘Dahongpao’	四川省蒲江县大兴镇	2015.11.29
XH	茶枝柑 <i>C. reticulata</i> ‘Chachi’	广东省广州市新会区	2015.11.30
CX	大红袍 <i>C. reticulata</i> ‘Dahongpao’	四川省广元市苍溪县	2015.12.10
BS	大红袍 <i>C. reticulata</i> ‘Dahongpao’	重庆市璧山区健龙镇	2015.12.16
LSJ	南丰蜜橘 <i>C. kinokuni</i> Tanaka	广西壮族自治区宜州市刘三姐镇	2015.12.21
PJHS	大红袍 <i>C. reticulata</i> ‘Dahongpao’	四川省蒲江县鹤山镇	2015.12.22

1.2 主要试剂和仪器

建库试剂盒 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit, Illumina 公司; QIAquick 胶回收试剂盒, QIAGEN 公司; Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer、高效高保真酶, New England Biolabs 公司。PTC200PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; HiSeq 2500 测序系统, Illumina 公司。

1.3 DNA 测序方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增: 采用口腔拭子基因组的取样方式, 使用无菌棉签在橘皮表面擦拭, 以擦拭面积计 5 cm × 5 cm 用 20 根棉签, 擦拭完后用剪刀将棉签部分从其杆上剪下, 采用 CTAB 法对其基因组 DNA 进行提取, 利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 取适量的样品于离心管中, 使用无菌水稀释样品至 10⁻⁶ g/L。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 根据测序区域的选择, 使用带 Barcode 的特异引物, Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶进行 PCR, 确保扩增效率和准确性。

引物对应区域 ITS5-1737F 和 ITS2-2043R。PCR 反应体系(30 μL): Phusion Master Mix (2×) 15 μL, 正反引物(2 μmol/L)各 1.5 μL, gDNA (1 mg/L) 10 μL, H₂O 2 μL。PCR 反应程序: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.3.2 PCR 产物的混样和纯化: PCR 产物使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测; 根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 充分混匀后使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 对目的条带使用胶回收

试剂盒回收产物。

1.3.3 文库构建和上机测序: 使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量, 文库合格后, 使用 HiSeq 2500 PE250 进行上机测序。

1.4 数据分析方法

1.4.1 测序数据处理: 根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样品数据, 截去 Barcode 和引物序列后使用 FLASH v1.2.7^[17]对每个样品的 Reads 进行拼接, 得到的拼接序列为原始 Tags 数据(Raw tags), Raw tags 经过滤处理^[18]得到高质量的 Tags 数据(Clean tags)。参照 QIIME v1.7.0^[19]对 Tags 进行质量控制, 将处理后得到的 Tags 序列通过 UCHIME algorithm^[20]与数据库 Unite database 进行比对检测嵌合体序列, 去除其中的嵌合体序列^[21], 得到最终的有效数据(Effective tags)。

1.4.2 OTU 聚类 and 物种注释: 利用 UPARSE v7.0.1001^[22]软件对所有样品的全部 Effective tags 进行聚类, 默认以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs (Operational taxonomic units), 同时选取 OTUs 的代表性序列, 依据其算法原则, 筛选出 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列。用 QIIME 软件中的 BLAST 方法^[23]与 Unit 数据库^[24]对 OTUs 代表序列进行物种注释分析, 并分别在各个分类水平统计各样本的群落组成。以样品中数据量最少的为标准对各样品的数据进行均

一化处理, 后续的 Alpha 多样性分析和 Beta 多样性分析都是基于均一化处理后的数据。

1.4.3 样品复杂度分析(Alpha diversity)、多样品比较分析(Beta diversity): 使用 QIIME 软件计算 Observed-species、Chao1、Shannon、Simpson、ACE 和 Goods-coverage 指数, 应用非加权组平均法(Unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)构建 UPGMA 样品聚类树。使用 R 软件 v2.15.3 绘制非度量多维尺度分析(Non-metric multi-dimensional scaling, NMDS)图。

2 结果与分析

经过对所有样品的测序结果进行分析处理, 去掉测序质量差的序列后, 每个样品得到的优化序列及序列平均长度见图 1。NMDS 分析将橘皮样本中所包含的真菌物种信息以点的形式反映在多维空间上, 基于 OTU 水平的 NMDS 分析结果见图 2, 图 2 中相同产地的样品点与点的距离较小, 表明平行样品间真菌群落结构相似度高, 结合 UPGMA 聚类分析结果(图 3), 证明研究所采集样品中相同产地间的样品能够聚为一类, 且 MRPP 组间差异分析(表 2)结果也证明研究样品中组间差异大于组内差异($A > 0$), 说明实验样本能真实地反映不同产地样品的真菌群落组成多样性。

研究所采集的橘皮样品通过高通量测序及分

析得到可分类 OTUs 数目共 17 724 个, 于不同分类水平分属于 7 个门、34 个纲、35 个目、35 个科、35 个属。在门的分类水平上(图 4), 不同产地样品间真菌群落组成一致, 均由 7 类真菌群落组成, 分别为子囊菌 (Ascomycota)、担子菌 (Basidiomycota)、球囊菌 (Glomeromycota)、接合菌 (Zygomycota)、壶菌 (Chytridiomycota)、Rozellomycota 和未分类真菌 (Others/Unclassified fungi), 其中子囊菌、担子菌、球囊菌和未分类真菌占整体的比例约为 68.7%、25.7%、0.5%和 5.0%, 其余三者为 0.1%。根据各类真菌在整体中所占比例, 在门分类水平上将真菌群落分为优势菌群、常见菌群和稀有菌群三大类。优势菌群为比例超过 30% 的真菌群落, 包括子囊菌; 常见菌群指那些比例小于 30%, 但在大多数样品中均出现的真菌群落, 包括担子菌和球囊菌。接合菌、壶菌与 Rozellomycota 虽然在研究的样品中存在, 但所占比例均小于 0.5%, 因此将其归为稀有菌群。在属的分类水平上, 根据每个样品的物种分类结果, 筛选出所有样品中的优势属, 分别为担孢酵母属 (*Erythrobasidium*)、青霉属 (*Penicillium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、红酵母属 (*Rhodotorula*)、球腔菌属 (*Mycosphaerella*)、枝孢霉属 (*Ramichloridium*)、*Cyphellophora*、短梗霉属 (*Aureobasidium*)、德巴利酵母属 (*Debaryomyces*)。

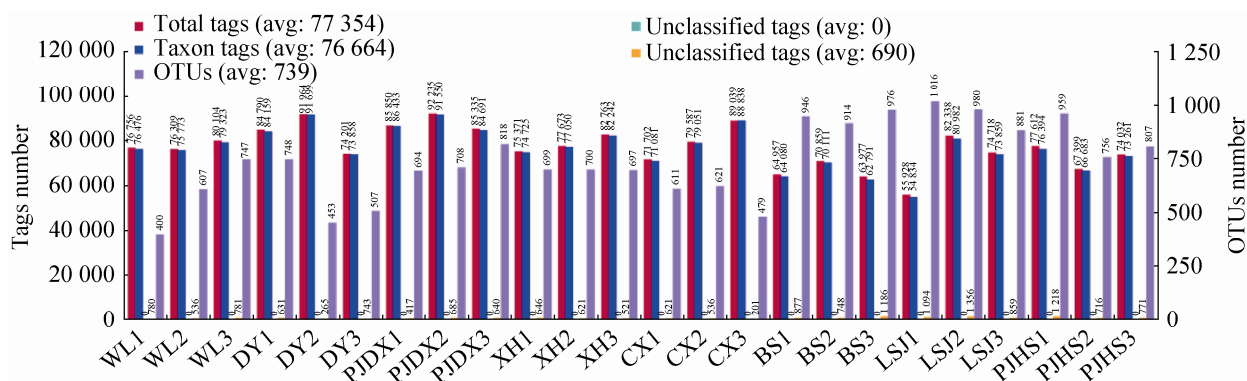


图 1 各样品的 OTUs 聚类 and 注释情况统计

Figure 1 Statistic analysis of the tags and OTUs number of each samples

注: 第一纵坐标(Tags number)分别指 Total tags (红色), Unique tags (橙色), Taxon tags (蓝色)和 Unclassified tags (茶绿色)的数目; 第二纵坐标(紫色)指每个样品得到的 OTUs 数目。

Note The Y1-axis titled "Tags number" means the numbers of tags; "Taxon tags" (Orange bars); "Unclassified tags" (Orange bars); The Y2-axis titled "OTUs numbers" (Purple bars) in the above picture to identify the numbers of OTUs in different samples.

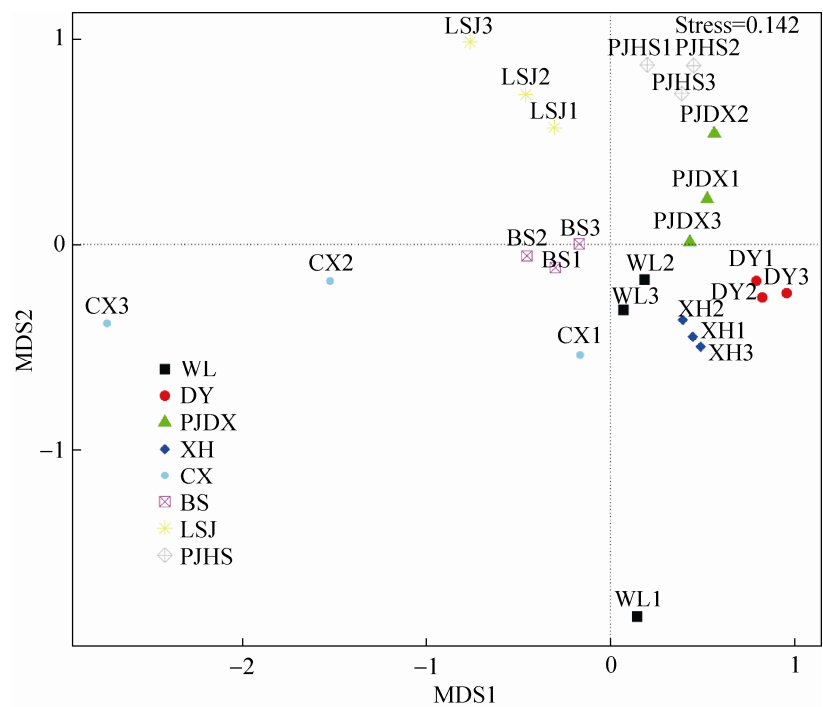


图 2 NMDS 分析

Figure 2 NMDS analysis

注：图中的每个点表示一个样品，点与点之间的距离表示差异程度，同一个组的样品使用同一种颜色表示。Stress 小于 0.2 时，表明 NMDS 分析具有一定的可靠性。

Note: Each point represents a sample, plotted by the second principal component on the Y-axis and the first principal component on the X-axis, which was colored by group.

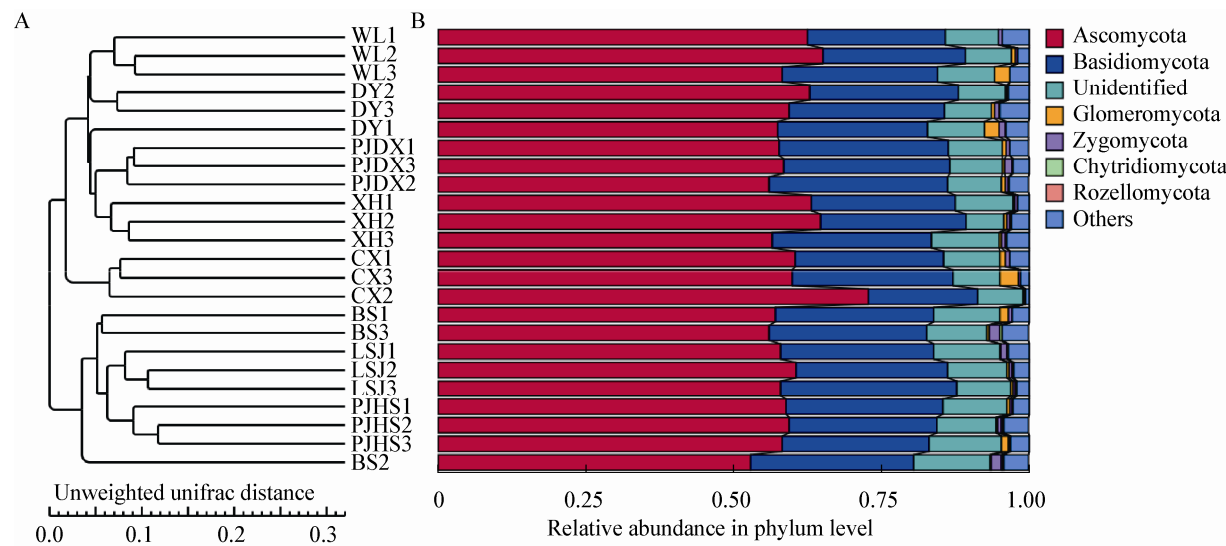


图 3 基于 Unweighted unfract 距离的 UPGMA 聚类树

Figure 3 UPGMA tree based on unweighted unfract

注：A：UPGMA 聚类树结构；B：各样品在门水平上的物种相对丰度分布图。

Note: A: Plotted with UPGMA tree; B: The relative phylum-level abundance map .

表 2 MRPP 组间差异分析
Table 2 Analysis of differences between groups MRPP

Group	<i>A</i>	Observed-delta	Expected-delta	Significance
CX-PJHS	0.163 6	0.695 3	0.831 3	0.1
CX-LSJ	0.207 7	0.636 6	0.803 5	0.1
LSJ-PJHS	0.325 4	0.470 4	0.697 4	0.1
CX-DY	0.205 6	0.634 6	0.798 9	0.1
DY-PJHS	0.342 0	0.468 5	0.712 0	0.1
DY-LSJ	0.415 6	0.409 8	0.701 2	0.1
CX-XH	0.179 5	0.645 7	0.786 9	0.1
PJHS-XH	0.321 4	0.479 5	0.706 6	0.1
LSJ-XH	0.391 4	0.420 8	0.691 5	0.1
DY-XH	0.337 7	0.418 9	0.632 5	0.1
CX-WL	0.059 9	0.771 4	0.820 6	0.2
PJHS-WL	0.193 3	0.605 3	0.750 3	0.1
LSJ-WL	0.267 5	0.546 6	0.746 2	0.1
DY-WL	0.202 1	0.544 6	0.682 6	0.1
WL-XH	0.162 3	0.555 6	0.663 3	0.1
CX-PJDX	0.130 1	0.724 1	0.832 5	0.1
PJDX-PJHS	0.170 0	0.558 0	0.672 3	0.1
LSJ-PJDX	0.283 8	0.499 3	0.697 1	0.1
DY-PJDX	0.218 5	0.497 3	0.636 4	0.1
PJDX-XH	0.240 3	0.508 4	0.669 1	0.1
PJDX-WL	0.137 1	0.634 1	0.734 8	0.1
BS-CX	0.151 6	0.671 7	0.791 7	0.1
BS-PJHS	0.276 8	0.505 5	0.699 0	0.1
BS-LSJ	0.337 6	0.446 8	0.674 5	0.1
BS-DY	0.326 7	0.444 9	0.660 7	0.1
BS-XH	0.325 3	0.455 9	0.675 7	0.1
BS-WL	0.172 1	0.581 6	0.702 5	0.1
BS-PJDX	0.237 2	0.534 4	0.700 6	0.1

注: Observe-delta 值越小说明组内差异小, Expect-delta 值越大说明组间差异大. *A* 值大于 0 说明组间差异大于组内差异, *A* 值小于 0 说明组内差异大于组间差异. Significance 值小于 0.05 说明差异显著.

Note: Smaller value of Observe-delta represents small differences in the group and the greater value of Expect-delta shows that the great differences between groups. The value of *A* greater than 0 represents the differences between groups is greater than the difference in the group. The differences in the group is greater than the difference between groups, conversely. Significance value which is less than 0.05 shows significant difference.

根据 MRPP 组间差异分析结果(表 3), 不同产地之间橘皮表面真菌群落组成无显著差异($P>0.05$)。但不同产地样品间 OTUs 种类数目各不相同: LSJ 为 2 877、BS 为 2 836、PJHS 为 2 522、PJDX 为 2 220、

XH 为 2 096、WL 为 1 754、CX 为 1 711、DY 为 1 708; 其中 24 份样品共同包含的 OTU 共有 65 个, 仅占各产地的 2%–3%。所有样品特有的 OTU 所占比例分别为 WL 2.0%、DY 1.5%、PJDX 1.8%、XH 2.2%、

CX 0.6%、BS 5.5%、LSJ 5.3%、PJHS 3.2%，这说明不同产地间橘果皮表面真菌群落组成结构相似，存在部分差异。在属的分类水平上，橘皮表面真菌群落组成种类及优势菌群在各产地间的相对丰度各不

相同，根据所有样品在属水平的物种注释及丰度信息(图 5)，根据其在每个样品中的丰度信息，分析并统计了各批次样品中的优势菌属，选取丰度排名前 5 的属，结果见表 3。

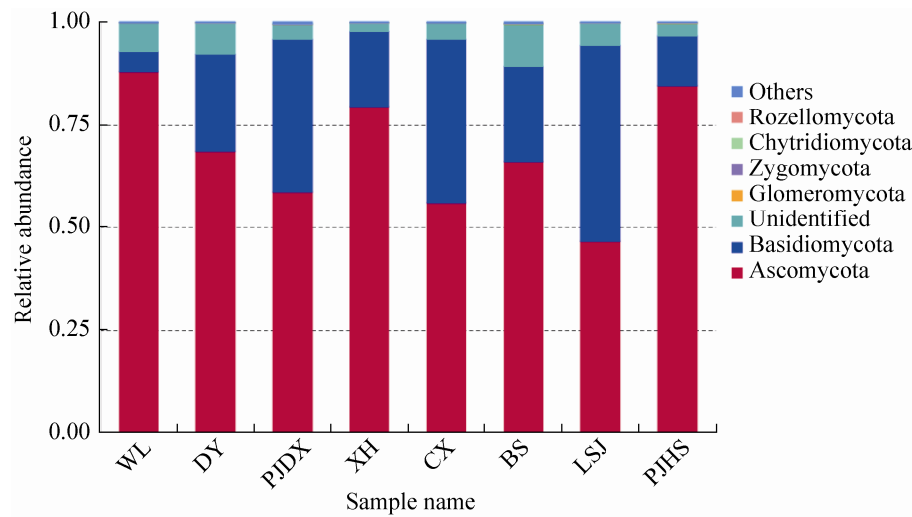


图 4 门水平上的物种相对丰度柱形图

Figure 4 Species relative abundance in the classification level of phylum

注：Others：图中这 10 个门之外的其他所有门的相对丰度之和。
Note: Others: Total relative abundance of the rest phylum besides the top 10 phylum.

表 3 8 批样品优势菌属分布情况
Table 3 The distribution of dominant fungi genera in 8 batch samples

样品编号 Sample No.	优势菌属 The predominant genera
WL	曲霉属 <i>Aspergillus</i> 、青霉属 <i>Penicillium</i> 、球腔菌属 <i>Mycosphaerella</i> 、枝孢属 <i>Cladosporium</i> 、枝氯霉属 <i>Ramichloridium</i>
DY	红酵母属 <i>Rhodotorula</i> 、担孢酵母属 <i>Erythrobasidium</i> 、短梗霉属 <i>Aureobasidium</i> 、假丝酵母属 <i>Candida</i> 、枝孢属 <i>Cladosporium</i>
PJDX	担孢酵母属 <i>Erythrobasidium</i> 、Tilletiopsis、球腔菌属 <i>Mycosphaerella</i> 、掷孢酵母属 <i>Sporobolomyces</i> 、红酵母属 <i>Rhodotorula</i>
XH	路德酵母属 <i>Lodderomyces</i> 、红酵母属 <i>Rhodotorula</i> 、假丝酵母属 <i>Candida</i> 、短梗霉属 <i>Aureobasidium</i> 、棘壳孢菌属 <i>Pyrenochaetopsis</i>
CX	德巴利酵母属 <i>Debaryomyces</i> 、腹膜孢酵母属 <i>Saccharomycosis</i> 、汉逊酵母属 <i>Hanseniaspora</i> 、青霉属 <i>Penicillium</i> 、球腔菌属 <i>Mycosphaerella</i>
BS	青霉属 <i>Penicillium</i> 、红酵母属 <i>Rhodotorula</i> 、联邦属 <i>Micarea</i> 、Biatora、担孢酵母属 <i>Erythrobasidium</i>
LSJ	<i>Cyphellophora</i> 、掷孢酵母属 <i>Sporobolomyces</i> 、枝孢属 <i>Cladosporium</i> 、担孢酵母属 <i>Erythrobasidium</i>
PJHS	枝氯霉属 <i>Ramichloridium</i> 、球腔菌属 <i>Mycosphaerella</i> 、横断孢属 <i>Strelitziana</i> 、兰伯盘菌 <i>Lambertella</i> 、光黑壳属 <i>Preussia</i>



图 5 物种丰度聚类图

Figure 5 Species abundance heatmap

注：纵向为样品信息，横向为物种注释信息，图中左侧的聚类树为物种聚类树。

Note: Plotted by sample name on the X-axis and the Y-axis represents the genus. The cluster tree on the left side of the graph is a species cluster tree.

3 讨论

既往报道主要在橘皮表面致病菌的分离鉴定和生物学特征上,对橘皮表面真菌群落结构组成研究未见报道。本研究首次利用高通量测序技术分析 8 个不同产地 24 批药用橘皮样品中真菌多样性,结果表明不同产地、批次橘皮样品中真菌群落组成相似度较高,无显著差异($P>0.05$),因此定殖于药用橘皮表面的真菌类群相似度高,受产地和品种影响小。高通量测序结果共得到 17 724 个 OTUs,有效序列可分类至 35 个属,其中优势菌群为子囊菌 Ascomycota,常见菌群为担子菌和球囊菌,担孢酵母属(*Erythrobasidium*)、青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、球腔菌属(*Mycosphaerella*)为最大相对丰度排名前 5 的属。

本研究结果表明橘皮表面真菌结构组成相似,其中青霉属、曲霉属为相对丰度较大的属,课题组前期在陈皮表面鉴定了黑曲霉、黄曲霉、烟曲霉、桔青霉和朱黄曲霉 5 种真菌,分属于青霉属与曲霉属。可见青霉属与曲霉属真菌在橘皮和陈皮中的检出率较高,分析葡萄表面和黑茶^[25]中的真菌结构多样性,发现青霉属与曲霉属在葡萄、茶叶中均有分布,为广分布真菌。本研究首次在橘皮表面发现短梗霉属和枝氯霉属真菌,短梗霉属真菌与酵母菌经常栖息在一起,一般通称为“类酵母真菌”,分布于植物和土壤中^[26]。枝氯霉属真菌是一种植物病原菌^[27-28],附生于橘皮表面形成黑色污斑引起柑橘煤污病。此外,还发现了球腔菌属真菌等常见的柑橘病原^[29-30],鉴定了红酵母 *Rhodotorula*^[31]、汉逊酵母属 *Hanseniaspora*、假丝酵母属 *Candida*^[32]等在水果、蔬菜以及果园土壤中常见的真菌。

上述青霉属、曲霉属真菌虽是橘或陈皮在存放过程中常见的致病菌和霉菌,但也有大量文献报道^[33-36]黑曲霉、桔青霉、指状青霉等真菌广泛应用于微生物转化,尤其是在植物次生代谢产物的研究方面取得了一定的进展,具有较大的应用前景,前期研究也报道了陈皮药材品质变化与真菌的相关性,初步证实陈皮中的真菌会引起陈皮药效物质基

础的变化,证明在陈化过程中真菌参与了陈皮药材品质的变化,因此研究陈化过程中真菌的优势类群具有重要意义,而橘皮在陈化过程中经历了贮藏环节,在本研究基础上,应对橘皮在贮藏过程中真菌群落变化进行研究,以阐释陈皮“陈久者良”提供科学依据。

参考文献

- [1] China Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Edition one)[M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2015: 191 (in Chinese) 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 191
- [2] Tao HJ. Collective Commentaries on the Classic of Materia Medica[M]. Shanghai: Group Press, 1955: 360-362 (in Chinese) 陶弘景. 本草经集注[M]. 上海: 群联出版社, 1955: 360-362
- [3] Lei X. Leigong Master Lei's Discourse on Drug Processing[M]. Shanghai: Shanghai Institute of Traditional Chinese Medicine Press, 1986: 52 (in Chinese) 雷敦. 雷公炮炙论[M]. 上海: 上海中医学院出版社, 1986: 52
- [4] Wang F, Zhang X, Lu JY, et al. Study of reason of "the older, the better" of Pericarpium Citri Reticulatae (PCR) which contributed increase of flavonoids[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(24): 4890-4896 (in Chinese) 王福, 张鑫, 卢俊宇, 等. 陈皮“陈久者良”之黄酮类成分增加原因探究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(24): 4890-4896
- [5] Min XF. Study on separation, identification and biological characteristics of *Penicillium* spp. causing diseases of citrus[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2007 (in Chinese) 闵晓芳. 柑橘采后致病青霉的分离鉴定及其生物学特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2007
- [6] Li CM. Physiological-biochemical mechanism on *Citrus* peel pitting fruit during storage[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2009 (in Chinese) 李聪敏. 柑橘贮藏期果皮褐斑的生理生化机理研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2009
- [7] Zhu L. Identification of five fungal pathogens causing *Citrus* diseases in China[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2012 (in Chinese) 朱丽. 五种柑橘真菌性病害病原鉴定[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2012
- [8] Bachy C, Dolan JR, López-García P, et al. Accuracy of protist diversity assessments: morphology compared with cloning and direct pyrosequencing of 18S rRNA genes and ITS regions using the conspicuous tintinnid ciliates as a case study[J]. The ISME Journal, 2013, 7(2): 244-255
- [9] Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M, et al. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data[J]. Methods in Ecology and Evolution, 2013, 4(10): 914-919
- [10] Findley K, Oh J, Yang J, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin[J]. Nature, 2013, 498(7454): 367-370
- [11] Degnan PH, Ochman H. Illumina-based analysis of microbial community diversity[J]. The ISME Journal, 2012, 6(1): 183-194
- [12] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. The ISME Journal,

- 2012, 6(8): 1621-1624
- [13] Shen ZZ, Ruan YZ, Wang BB, et al. Effect of biofertilizer for suppressing *Fusarium* wilt disease of banana as well as enhancing microbial and chemical properties of soil under greenhouse trial[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 93: 111-119
- [14] Xia WW, Zhang CX, Zeng XW, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(7): 1226-1236
- [15] Findley K, Oh J, Yang J, et al. Human skin fungal diversity[J]. *Nature*, 2013, 498(7454): 367-370
- [16] Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, et al. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(1): E139-E148
- [17] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963
- [18] Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 57-59
- [19] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [20] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200
- [21] Haas BJ, Gevers D, Earl AM, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. *Genome Research*, 2011, 21(3): 494-504
- [22] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998
- [23] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3): 403-410
- [24] Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi[J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22(21): 5271-5277
- [25] Xu SZ. Fungal community analysis of Liupao Tea[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2014 (in Chinese)
徐书泽. 六堡茶中真菌的多样性分析[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2014
- [26] Cui TB, Guo Y, Zheng SP. Research progress of *Aureobacidium pullulans*[J]. *Industrial Microbiology*, 2002, 32(2): 41-47 (in Chinese)
- 崔堂兵, 郭勇, 郑穗平. 出芽短梗霉的研究进展[J]. *工业微生物*, 2002, 32(2): 41-47
- [27] Zhou XY, Zhang B, Geng K, et al. Pathogens of citrus sooty moulds[J]. *Mycosystema*, 2013, 32(4): 758-763 (in Chinese)
周小燕, 张斌, 耿坤, 等. 柑橘煤污病病原菌的研究[J]. *菌物学报*, 2013, 32(4): 758-763
- [28] Li HY. Taxonomy of related fungal genera causing sooty blotch and flyspeck and their diversity in China[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest Agriculture and Forestry University of Science and Technology, 2012 (in Chinese)
李焕宇. 煤污病相关真菌属分类及中国种类多样性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2012
- [29] Wilson CL, Wisniewski ME, Biles CL, et al. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides[D]. *Crop Protection*, 1991, 10(3): 172-177
- [30] Quaedvlieg W. Re-evaluating *Mycosphaerella* and allied genera[J]. Utrecht: Utrecht University, 2014
- [31] Wirth F, Goldani LZ. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen[J]. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012, 2012: 465717
- [32] Wang H, Zhang LQ, Liu TM, et al. Species diversity of yeasts on the surface of grape[J]. *Microbiology of China*, 2008, 35(1): 10-14 (in Chinese)
王慧, 张立强, 刘天明, 等. 葡萄果粒表皮酵母菌多样性研究[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(1): 10-14
- [33] Zhao TJ. Biotransformation of Ginsenoside Rb1 by *Aspergillus niger* sp. J7[D]. Changchun: Master's Thesis of Northeast Normal University, 2013 (in Chinese)
赵天蛟. 一株黑曲霉转化人参皂苷 Rb1 的研究[D]. 长春: 东北师范大学硕士学位论文, 2013
- [34] Xi XM, Zeng GM, Yu HY, et al. Lignocelluloses degrading ability of *Aspergillus niger* and the enzyme production[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(4): 1506-1511 (in Chinese)
习兴梅, 曾光明, 郁红艳, 等. 黑曲霉 *Aspergillus niger* 木质纤维素降解能力及产酶研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(4): 1506-1511
- [35] Demyttenaere JCR, van Belleghem K, de Kimpe N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening[J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(2): 199-208
- [36] Tan Q, Day DF. Bioconversion of limonene to α -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 49(1): 96-101