

## 基于高通量测序技术分析霉变核桃仁真菌多样性

方 圆<sup>1</sup>, 苏高雅<sup>2</sup>, 王卫雄<sup>3</sup>, 白永超<sup>2</sup>, 王丰俊<sup>1\*</sup>, 裴 东<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 林木资源高效生产全国重点实验室 林业食品加工与安全北京市重点实验室  
北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083

<sup>2</sup> 林木遗传育种国家重点实验室 国家林业和草原局林木培育重点实验室  
中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091

<sup>3</sup> 东北林业大学生命科学学院 哈尔滨 150040

**摘要** 目的:研究核桃仁在适宜霉变条件(温度 25 ℃、相对湿度 85%)下的真菌侵染过程,揭示其霉变过程中真菌群落的结构与真菌群落样性变化。方法:采用 Illumina Miseq 高通量测序方法分析核桃仁霉变过程中的真菌群落组成和多样性。结果:子囊菌门是核桃样品霉变的主要真菌门类,相对丰度在 27.41%~99.98% 范围,其次是担子菌门,相对丰度在 0.01%~32.56% 范围。在真菌属水平上,霉变过程中的主要优势种群为镰孢菌属、链格孢属、赤霉属与曲霉属。1 周内核桃仁的霉变过程可大致分为 I 期(0~2 d)、II 期(3~4 d)、III 期(5~7 d)3 个时期,II 期与 I 期相比镰孢菌属出现明显的富集,III 期与 II 期相比镰孢菌属、链格孢属与曲霉属出现明显的富集,III 期与 I 期相比镰孢菌属、链格孢属与曲霉属出现明显的富集。结论:核桃仁霉变过程中真菌微生物群落的变化分为 3 个时期,真菌多样性呈下降趋势,镰孢菌属、链格孢属与曲霉属是其霉变的优势真菌种群。

**关键词** 核桃;霉变;真菌;高通量测序;真菌群落多样性

文章编号 1009-7848(2023)08-0369-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.08.036

核桃正常成熟采收后,需要经过脱青皮、清洗和干燥等处理环节,特别是当坚果壳缝合线有裂口或不紧密时,容易出现发霉现象。目前,市场销售的主栽品种均为薄壳类型,核壳厚度 $\leq 1$  cm,紧密度较小<sup>[1]</sup>,在采收处理、运输、储藏过程中,由于机械振动或坚果之间的相互挤压,会出现坚果壳破裂、缝合线开裂的现象,因此导致外界真菌容易侵入,核桃大量发霉。核桃霉变时核桃仁中的有机物质被微生物分解利用<sup>[2]</sup>,使其营养价值降低,影响核桃品质及其综合利用价值。另外,真菌侵染核桃仁后,其在大量生长繁殖的同时会产生一部分已被证实具有致癌、致畸、致细胞突变作用的真菌毒素<sup>[3]</sup>。因此,研究霉变过程中核桃仁微生物群落的组成与多样性,对核桃及相关产品的安全生产具有重要的理论研究和实际应用意义。

利用传统的分离培养方法获得样品中的微生物,

仅能对可培养的微生物进行分离和鉴定,而无法实现样品中全部微生物的分离,然而,可培养微生物仅占环境微生物总量的 1%~10%<sup>[4]</sup>。传统分离培养方法无法完整地揭示环境中微生物群落的组成和结构。微生物扩增子测序技术具有高通量、高灵敏度、高准确性和低运行成本的优点<sup>[5-8]</sup>,已广泛应用于环境微生物的多样性分析。张文齐等<sup>[9]</sup>运用高通量测序技术发现酵母菌属(*Saccharomyces*)、克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces*)及毕赤酵母属(*Pichia*)是甘南牧区牦牛酸奶中的优势菌属。陈乾丽等<sup>[10]</sup>发现烤烟叶柄和叶际样品共有的真菌种群为曲霉属(*Aspergillus*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、赤霉属(*Gibberella*)和链格孢属(*Alternaria*),其中曲霉属所占丰度均最高。徐圆程等<sup>[11]</sup>以湖南衡阳仓储稻谷为研究对象,不同储藏环境稻谷的优势菌种为白僵菌(*Beauveria bassiana*)、黄曲霉(*A. flavus*)和黑孢霉(*Nigrospora oryzae*),且黄曲霉占比随着湿度的升高呈增加趋势。此外,高通量测序技术开始应用在香肠<sup>[12]</sup>、酸菜<sup>[13]</sup>等食品微生物群落的分析中。目前,还鲜见对核桃霉变过程真菌群落的研究。采用高通量测序技术能更好地揭示真菌

收稿日期: 2022-10-26

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1000104-03);  
新疆维吾尔自治区重大科技专项(2022A02009-4)

第一作者: 方圆,女,硕士

通信作者: 王丰俊 E-mail: wangfengjun@bjfu.edu.cn

菌群在核桃霉变过程中的动态变化规律。

本研究以新鲜采摘的核桃仁为对象,采用高通量测序技术,研究其在恒温箱中人为设定的环境条件下<sup>[3]</sup>(温度 25 ℃,相对湿度为 85%)霉变过程中的真菌群落结构及多样性,确定霉变的主要真菌菌群,为核桃仁的安全评价提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品与试剂

试验样品于 2021 年 9 月 10 日采自中国林业科学研究院内核桃品种“林早香”成熟果实,该树健康状况良好,树体、枝干和叶片等部位未见病虫害侵染痕迹。

OMEGA Soil DNA Kit,上海派森诺生物科技有限公司;琼脂糖,上海玉博生物科技有限公司;FastPfu Polymerase,北京全式金生物技术公司;AxyPrep DNA Gel/Extraction Kit,杭州爱思进生物技术有限公司;PCR 相关试剂,东洋纺上海生物科技有限公司;测序试剂盒,上海因美纳公司。

### 1.2 仪器与设备

Eppendorf N13462C 移液器、Eppendorf 5427R 离心机,德国艾本德股份公司;明澈 TM-D 超纯水仪器,上海乐枫生物科技有限公司;NanoONE 分光光度计,杭州佑宁仪器有限公司;BioTek ELx800 酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;米欧 mix-28+ 涡旋振荡器,广州围古润仪器有限公司;FastPrep-24 5G MP 研磨仪,上海安倍医疗器械贸易有限公司;TBS-380 微型荧光计,上海精密仪器有限公司;DynaMag-15 磁力架,上海生工生物工程(上海)股份有限公司;DYY-6C 电泳仪,北京市六一仪器厂;Tanon-2500 凝胶成像系统,上海天能科技有限公司;ABI GeneAmp®9700 型 PCR 仪,美国应用生物系统公司;Q33216 Qubit 3.0,美国赛默飞世尔科技公司;Illumina Miseq 测序仪,上海因美纳公司。

### 1.3 样品处理方法

1.3.1 核桃处理及保存 共采摘 80 颗大小均一、表面无明显病虫害损伤的核桃青果。将采摘后成熟核桃青果立即人工去青皮,并用无菌核桃夹配合无菌镊子去壳,取出完整核桃仁,并进行第 1 次种皮收集,作为第 0 天样品(CK)。随后将核桃仁

置于人为设定的环境条件下(温度 25 ℃,相对湿度为 85%),模拟核桃仁霉变过程。从第 0 天开始,每隔 24 h 取 1 次核桃种皮(随机剥取 7~8 颗核桃仁种皮),快速放入无菌袋中保存(分别将样品编为:0、1、2、3、4、5、6、7),-80 ℃冻存,试验过程中共获得第 0、1、2、3、4、5、6、7 天的种皮样品(每次取样样品大于 2 g),用于核桃种皮 DNA 的提取,原文统一使用 CK、D1、D2、D3、D4、D5、D6、D7 表示。

1.3.2 基因组 DNA 提取 提取样品基因组 DNA,放入-20 ℃进行冻存。DNA 浓度和纯度测定使用 NanoDrop 2000 测定。使用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,电压 5 V/cm,时间为 20 min;将符合测序要求的 DNA 样品置于-80 ℃保存。

1.3.3 PCR 扩增 采用特异引物 ITS1:CTTGGT-CATTTAGAGGAAGTAA,ITS2:GCTGCGTTCCTCA TCGATGC,扩增程序为:在 98 ℃条件下进行预变性 5 min,经过 25 个循环(98 ℃条件下变性 30 s,53 ℃条件下退火 30 s,72 ℃条件下延伸 45 s),72 ℃延伸 5 min,4 ℃保存。PCR 反应体系为:5× TransStart FastPfu 缓冲液 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,上游引物(10 μmol/L)1 μL,下游引物(10 μmol/L)1 μL,Fast PFU DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL,模板 DNA 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 14.75 μL。每个样本 3 个重复。使用 Illumina MiSeq 平台对真菌的转录间隔区(ITS)的 PCR 扩增产物进行核酸序列测序。

1.3.4 Miseq 高通量测序 由上海派森诺生物科技有限公司完成 Illumina MiSeq 高通量测序工作。

1.3.5 扩增子测序分析 利用 QIIME2 2019<sup>[14]</sup>(<https://docs.qiime2.org/2019.4/tutorials/>)进行微生物组生物信息学分析。使用 demux 对原始序列数据进行多路分解,然后使用 cutadapt 对引物进行切割<sup>[15]</sup>,然后使用 DADA2 对序列进行质量过滤、去噪、合并和去除嵌合体<sup>[16]</sup>。首先通过去除包含未知的核苷酸(N)和引物的序列,得到高质量的 reads,避免含有引物或未知核苷酸(N)碱基的原始 reads 对后续的组装和分析的影响。然后,输出唯一序列及其丰度列表以及每个唯一序列的位置质量得分,这些得分将被用于错误模型构建。

DADA2 的 reads 降噪通过机器学习构建参数误差模型完成,即进行 reads 校正,去除低质量 reads。然后按最小重叠区域长度(12 bp) 将成对的末端去噪 reads 合并为原始的不同扩增子序列(Ampli-con sequence variants, ASVs)。基于 UCHIME, 识别并去除嵌合体的序列。根据 97% 的相似度对序列进行 ASV 聚类并剔除嵌合体<sup>[17]</sup>。真菌 ITS 序列默认选用 UNITE 数据库<sup>[18]</sup>(Release 8.0, <https://unite.ut.ee/>), 采用 QIIME2 的 classify-sklearn 算法<sup>[19]</sup>(<https://github.com/QIIME2/q2-feature-classifier>)进行分析。根据最少序列数(10 万 tags)对所有样本进行随机抽平, 将抽平后的数据基于 ASV 丰度信息统计获得各层级的物种丰度信息, 进行

物种组成、Alpha 多样性、Beta 多样性、物种差异与标志物种分析等生物信息分析。序列数据分析主要使用 QIIME2 和 R 软件包(v3.2.0)。

## 2 结果与分析

### 2.1 核桃微生物侵染表征

将核桃仁置于恒温恒湿条件下,每隔 24 h 取 1 次核桃种皮样品, 图 1 中呈现分别是第 0 天到第 7 天的核桃仁霉变情况(图 1), 可以观察到在这 1 周的霉变过程中, 伴随着褐变程度不断加深, 核桃仁也出现了轻微的脱水皱缩情况, 霉变后期可观察到部分核桃仁局部出现灰褐色菌丝。

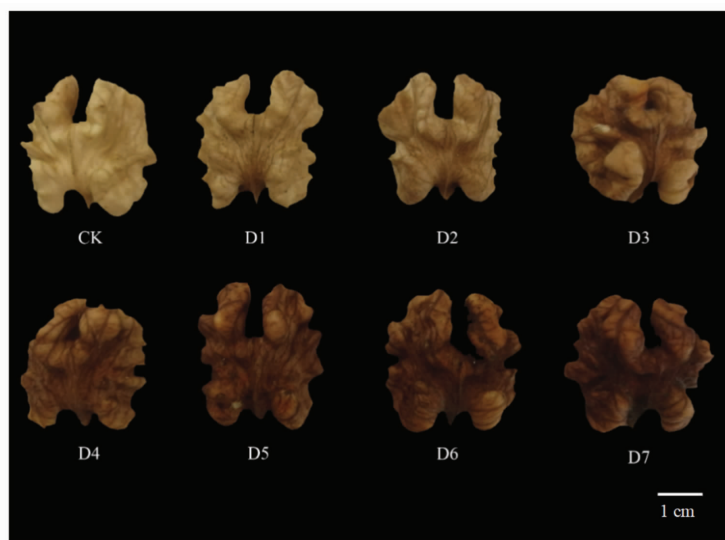


图 1 核桃仁的霉变过程

Fig.1 The moldy process of walnut meat

### 2.2 测序深度及维恩图分析

2.2.1 测序深度分析 通过分析稀释曲线, 发现随着测序深度的增加, 稀释曲线逐渐趋于平缓(图 2), 表明在本研究中, 对核桃仁表皮的真菌群落测序结果已足够反映样本中真菌群落的多样性。

2.2.2 霉变过程中共有与特有 ASV 分析 为明确不同样本间的相同与差异物种, 使用维恩图呈现处理 0~7 d 的核桃样品中共有和特有 ASV 的数量。结果表明, 不同核桃样品之间 ASV 变化较大, 8 组样品中共有 ASVs 仅有 6 个, 这些 ASVs 在分类学上分别属于 ASV-109 曲霉菌属、ASV-336 镰

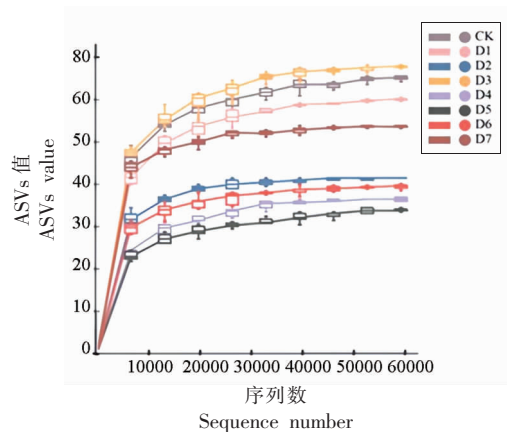


图 2 样品稀释曲线

Fig.2 Sample rarefaction curves



孢菌属 (*Fusarium*)、ASV-647 马拉色氏霉属 (*Malassezia*)、ASV-702 红藻门-未分类菌属 (*Rozellomycota-unidentified*)、ASV-760 赤霉属 (*Gibberella*) 与 ASV-797 被孢霉属 (*Mortierella*) (图 3)。第 2 天(439 个)和第 4 天(397 个)的特有 ASVs 数量最多,而在第 5 天(67 个)和第 6 天(73 个)的独有 ASVs 数量较少。总体上,特有 ASVs 的数量随着核桃仁霉变呈现先增加后减少的趋势。

### 2.3 霉变过程中真菌群落的 $\beta$ -多样性分析

为了更直观地了解核桃样本的物种组成差异和丰度分布趋势,对 0~7 d 核桃样品进行物种组成分析(图 4)。按照其组成数据的皮尔森相关性系数(Pearson correlation coefficient)进行 UPGMA 聚类后,发现第 0~2 天样品、第 3~4 天样品和第 5~7 天样品聚类成 3 个簇,因此,可以将核桃仁的霉变过程分为 3 个时期,分别为 I 期(0~2 d)、II 期(3~4 d)、III 期(5~7 d)。

### 2.4 霉变过程中真菌群落的 $\alpha$ -多样性分析

$\alpha$ -多样性分析结果表明,霉变过程中 I 期和 III 期的 Shannon 和 Pielou 指数(真菌菌群均匀度)均存在显著差异;此外, I 期和 II 期的 Pielou 指数也存在显著差异。虽然对 Simpson 指数的计算过程中并没有发现这 3 个时期之间的显著性差异,但总的来看,在霉变的过程中,真菌菌群的  $\alpha$ -多样性呈现逐渐下降的趋势(图 5)。

### 2.5 核桃仁样本真菌物种比较分析

2.5.1 门水平比较分析 在真菌门水平上的分析结果表明,第 0 天至第 7 天的核桃仁样品真菌群落组成中,共检测到 6 个真菌门类(图 6)。子囊菌门占 27.41%~99.98% 的相对丰度,其次为担子菌门占 0.01%~32.56% 的相对丰度,可见子囊菌门为核桃仁霉变中的主要真菌门类。

2.5.2 属水平的比较分析 分析不同时期核桃样品在属水平上的真菌群落组成,相对含量前 10 位的真菌种群包括镰孢菌属、链格孢属、赤霉属、曲霉属、未分类菌属(Unclassified Fungi)、帚枝霉属(*Sarocladium*)、马拉色氏霉菌属、被孢霉属、小孢拟棘壳孢属(*Pyrenochaetog*)、青霉菌属(*Penicillium*)等。霉变 I 期中除未分类真菌外优势菌属主要是链格孢属;II 期中优势菌属为镰孢菌属、链格孢属与赤霉属;III 期中优势菌属为镰孢菌属、链格

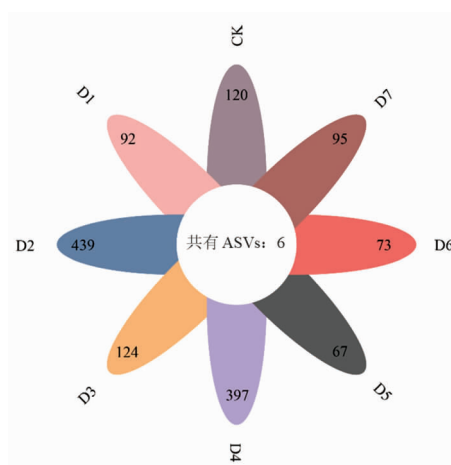


图 3 不同样品的共有与特有 ASVs

Fig.3 Common and unique ASVs of different samples

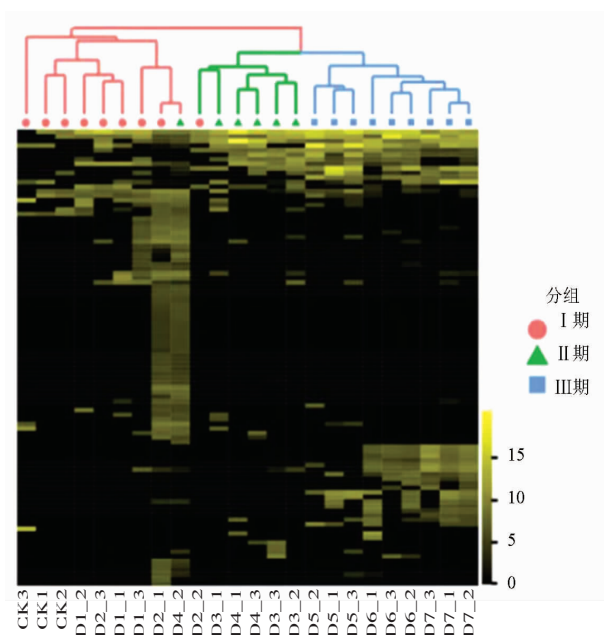


图 4 ASVs 水平聚类分析

Fig.4 ASVs level clustering analysis

孢属、赤霉属与曲霉属。通过对不同阶段核桃样品属水平上真菌群落结构的分析比较,发现相近霉变时期核桃仁样品真菌群落包含的真菌种类虽相似,但组成比例不同(图 7)。

### 2.6 霉变过程中真菌群落的富集分析

利用 Edge R 对不同霉变时期核桃仁样品真菌群落差异进行分析,结果表明,II 期与 I 期的核桃仁真菌群落相比有 1 个 ASV 富集 (ASV-1034),该 ASV 属于镰孢菌属;III 期与 II 期的核桃

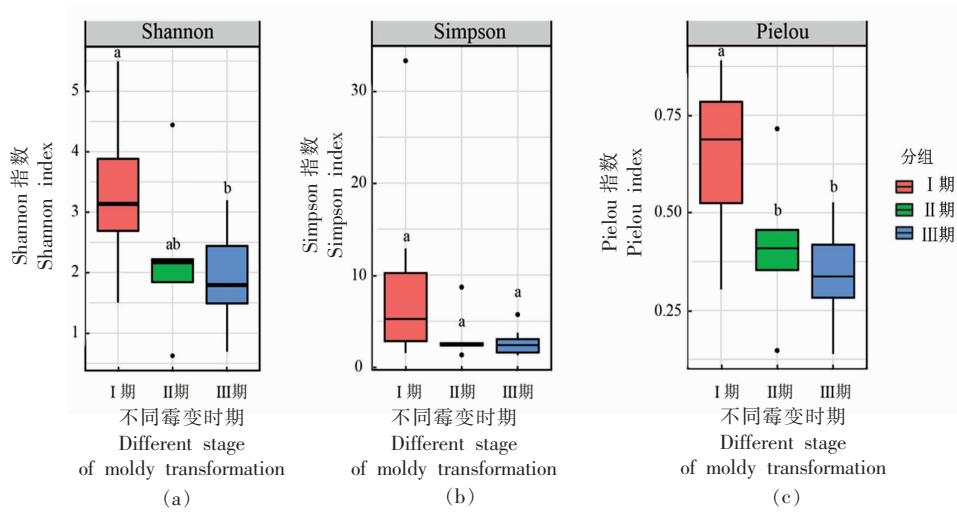


图 5 不同分组样品真菌群落的  $\alpha$ -多样性指数

Fig.5  $\alpha$ -Diversity index of fungal communities in different groups

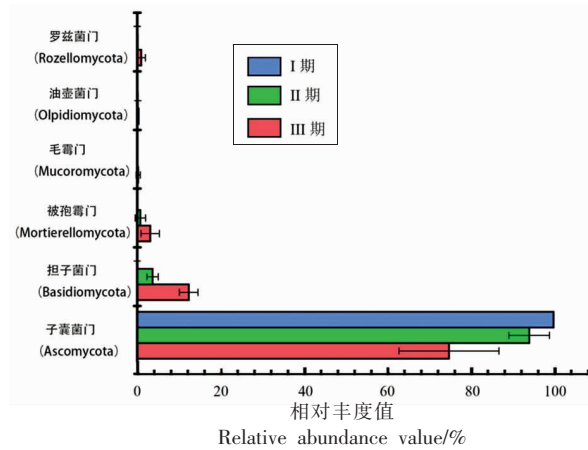


图 6 基于门水平不同时期霉变核桃样品真菌的群落结构

Fig.6 Fungal phylum-level community structure of moldy walnut samples at different stages

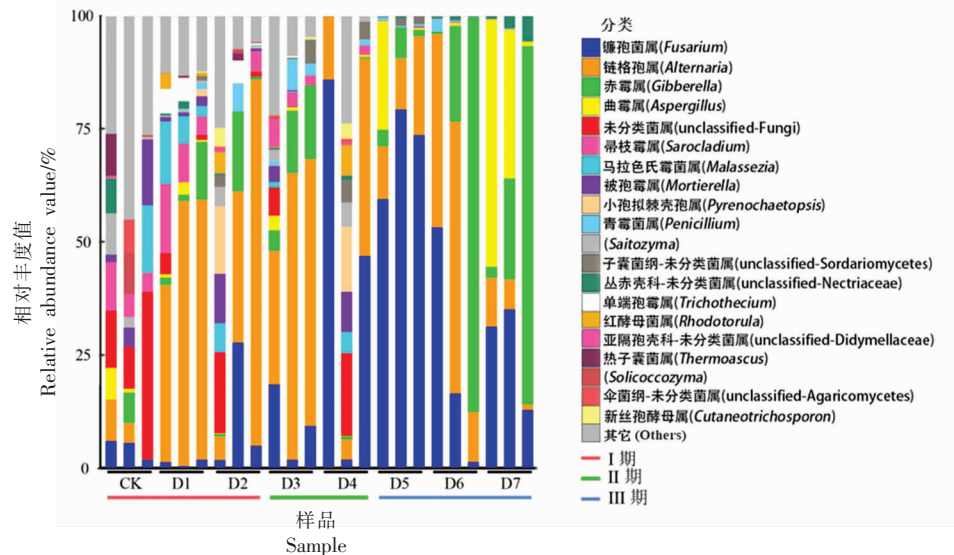
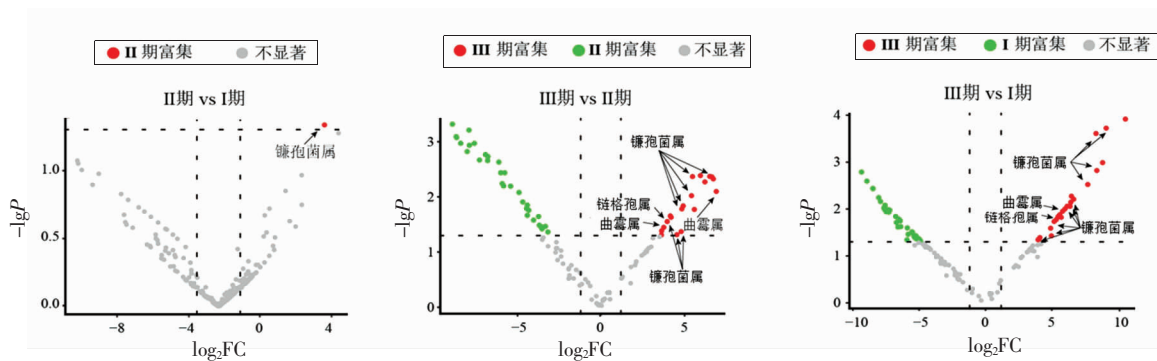


图 7 核桃仁霉变不同时期真菌群落的属水平结构

Fig.7 Fungal genus-level community structure of moldy walnut samples at different stages

仁真菌群落相比有 19 个 ASVs 发生了富集,其中有 11 个 ASVs (ASV-220、ASV-263、ASV-266、ASV-318、ASV-336、ASV-361、ASV-541、ASV-687、ASV-763、ASV-767、ASV-1080) 属于镰孢菌属,2 个 ASVs (ASV-109、ASV-434) 属于曲霉属,1 个 ASV (ASV-1021) 属于链格孢属;Ⅲ期与Ⅰ期的核桃仁真菌群落相比,有 22 个 ASVs 发生了富集,其中有 13 个 ASVs (ASV-162、ASV-187、ASV-

220、ASV-266、ASV-263、ASV-318、ASV-336、ASV-361、ASV-540、ASV-687、ASV-763、ASV-857、ASV-893) 属于镰孢菌属,1 个 ASV (ASV-434) 属于曲霉属,1 个 ASV (ASV-1021) 属于链格孢属(图 8)。分析发现,随着霉变时间的延长,在核桃仁上会有更多的镰孢菌属、曲霉属、链格孢属的 ASVs 富集。



(a) Ⅱ期与Ⅰ期的核桃仁真菌群落差异 (b) Ⅲ期与Ⅱ期的核桃仁真菌群落差异 (c) Ⅲ期与Ⅰ期的核桃仁真菌群落差异

图 8 不同霉变时期核桃仁真菌群落富集或减少 ASVs 火山图

Fig.8 Volcanic diagram of ASVs enrichment or decrease of walnut kernel fungal communities at different moldy stages

### 3 讨论

在本研究中,被霉菌侵染的核桃仁呈现干瘪收缩、质量变轻、颜色变深甚至被霉层覆盖等现象,这与冯晓娟等<sup>[20]</sup>发现致病霉菌引起核桃仁发生霉烂病的结果一致。此外,李亚婷<sup>[21]</sup>研究发现,霉菌污染核桃后,可加速核桃的劣变,特别是氧化哈败。在微生物作用下发生的酮型酸败,油脂分解产生具有酸臭味的低级酮类<sup>[22]</sup>。一旦核桃遭受霉菌侵染,引起破坏性腐烂,核桃的品质、食用及商用价值均将受到影响<sup>[23]</sup>。然而,在霉变初期,霉菌肉眼不易观察,在生长的早期也很难被发现。若能在产生毒素之前抑制真菌比在产生毒素后清除毒素更为重要,也是一种更好的防治策略<sup>[24]</sup>。因此,阐明核桃霉变时真菌群落的演替规律可为控制核桃霉变提供理论参考。

传统的微生物培养方式存在一定的局限性,不能很好地了解所有可能侵染微生物的群落结构特征。以群落特征为突破口,阐述微生物多样性的研究方法已成为重要的研究策略<sup>[25]</sup>。本研究采用

高通量测序技术初步分析了适宜环境条件下核桃仁霉变过程中真菌群落的组成与结构,明确了霉变过程中污染核桃仁的主要真菌类群,克服了传统培养方法中不可培养以及低丰富度真菌无法检测到的缺点,为深入解析核桃仁霉变过程中真菌群落组成与多样性的动态变化奠定了坚实的方法学基础。

聚类分析的结果表明,霉变第 0~2 天样品(Ⅰ期)、霉变第 3~4 天样品(Ⅱ期)和霉变第 5~7 天样品(Ⅲ期)分别聚为 1 组,对以上 3 个阶段的核桃仁样本进行深入研究后发现,霉变过程中样品真菌群落的丰富度虽不存在显著差异,但其多样性总体上呈现下降的趋势,霉变后期真菌多样性降低可能是因为适宜的环境条件下,优势真菌快速生长,使得其它真菌种群的生长受到抑制<sup>[26]</sup>,也可能是由内生真菌通过拮抗作用对病原菌生长产生不同程度的抑制作用<sup>[27]</sup>。随着霉变时间的延长在核桃仁上会有更多的镰孢菌属、曲霉属与链格孢属的 ASVs 富集。本研究发现子囊菌门(As-

comycota) 是核桃样品霉变过程中的主要真菌类群,在分类学属水平上,镰孢菌属、链格孢属、赤霉属以及曲霉属呈现明显富集现象。已有研究证实有害菌属在核桃上产生真菌毒素,镰孢菌主要通过破坏植物细胞结构<sup>[28]</sup>和分泌毒素<sup>[30]</sup>两种途径致病;而赤霉菌是镰孢菌的有性阶段<sup>[31]</sup>,代谢过程中产生的毒素可以造成人和动物的急、慢性真菌中毒。链格孢属真菌分泌的毒素会对牲畜和人体产生慢性或急性毒性作用<sup>[32]</sup>。此外,黄曲霉菌分泌的黄曲霉毒素具有肝毒性和免疫毒性<sup>[33]</sup>,对人类健康构成重大威胁<sup>[35]</sup>,熟制坚果及籽类中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量不得超过 5 μg/kg<sup>[36]</sup>。因此,当这些致病菌富集达到一定程度,最终导致核桃仁明显霉变,且可能含有较多的真菌毒素。

耿阳阳等<sup>[37]</sup>对贵州“纸皮核桃”果实表面的病原菌进行分离与鉴定,发现优势菌属为毛霉属(*Mucor*)、镰孢菌属、曲霉属。李亚婷<sup>[21]</sup>以秦岭采摘的发霉核桃仁为原料,发现引起核桃仁霉变的霉菌主要为镰孢菌属、链格孢属、曲霉属、青霉属、毛霉属。Wei 等<sup>[38]</sup>调查发现,镰孢菌属、链格孢属、青霉属和曲霉属是西北地区核桃贮藏过程中的优势病原菌,而毛霉属、木霉属(*Trichoderma*)和枝孢霉属(*Cladosporium*)所占比例较低。黄凯等<sup>[39]</sup>以西林 2 号为试材,对引发霉变的病原菌进行了分离和鉴定,证明其为扩展青霉(*Penicillium expansum*)。李勇鹏等<sup>[40]</sup>以漾濞泡核桃新鲜壳果为研究材料,发现扩展青霉和木贼镰孢菌(*Fusarium equiseti*)为低温贮藏条件下导致鲜核桃样品发生霉变的主要真菌种类。试验中核桃仁样品在不同时期检测到的菌落组成与样品保存不当引起核桃自然霉变检测到的真菌群落组成相似,受外界条件、环境基质等的影响<sup>[26]</sup>,样品优势菌属的组成方面是存在区别的。总体上,人工处理的核桃仁样本与自然界条件下核桃仁样本的真菌微生物组具有可比性。

本项研究通过高通量测序技术解析出了核桃仁霉变过程中真菌群落的动态变化,特别是镰孢菌属、链格孢属、赤霉属与曲霉属等主要常见真菌,这些真菌均易于人工培养,因此,本研究还有待于通过人工培养鉴定予以进一步确认。

## 4 结论

本研究初步分析了适宜环境条件下造成核桃仁霉变过程中真菌污染的主要真菌种群。结果发现镰孢菌属、链格孢属、赤霉属以及曲霉属为核桃霉变过程中的优势真菌种群。核桃霉变过程明显分为 3 个阶段,该过程中真菌多样性呈现下降趋势,有害病原菌所占的相对丰度逐渐增大。

## 参 考 文 献

- [1] 齐静. 中国主栽区核桃坚果品质研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.  
QI J. Study on walnut nut quality in main growing areas of China[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2009.
- [2] 郭卫. 粮食霉变过程品质变化及毒素识别初探[D]. 郑州: 河南工业大学, 2011.  
GUO W. Preliminary study on quality change and toxin identification of grain mildew process [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2011.
- [3] 刘金, 张立钊, 陈力力, 等. 储藏期油茶籽霉菌多样性分析[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(9): 85–92.  
LIU J, ZHANG L Z, CHEN L L, et al. Fungal diversity analysis of *Camellia oleifera* seeds during storage[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Society, 2018, 33(9): 85–92.
- [4] PARENTE E, RICCIARDI A, ZOTTA T. The microbiota of dairy milk: A review [J]. International Dairy Journal, 2020, 107(1): 104714.
- [5] ZHANG Y J, SKAAR I, SULYOK M, et al. The microbiome and metabolites in fermented Pu-erh tea as revealed by high-throughput sequencing and quantitative multiplex metabolite analysis [J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0157847.
- [6] CHEN Y W, WU B, ZHANG C, et al. Current progression: Application of high-throughput sequencing technique in space microbiology[J]. BioMed Research International, 2020, 2020(3): 1–13.
- [7] SONG W F, LI M C, GAO Z. Research progress on *in situ* detection methods of microorganisms [J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(10): 26–32.
- [8] CAO C X, HAN W, ZHANG H P. Application of third generation sequencing technology to microbial research [J]. Microbiology China, 2016, 43 (10):



- 2269–2276.
- [9] 张文齐, 麻和平, 刘彩云, 等. 高通量测序分析不同采集保存温度下甘南牧区牦牛酸奶真菌多样性[J]. 食品工业科技, 2021, 42(13): 163–169.  
ZHANG W Q, MA H P, LIU C Y, et al. High-throughput sequencing analysis of yak yoghurt fungal diversity under different collection and storage temperatures in Gannan grazing area[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(13): 163–169.
- [10] 陈乾丽, 李忠, 汪汉成, 等. 烤后不同霉变程度烟叶际真菌群落组成与多样性分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(12): 2401–2409.  
CHEN Q L, LI Z, WANG H C, et al. Fungal community composition and diversity analysis of tobacco leaf with different mildew degree after curing[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(12): 2401–2409.
- [11] 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, 2021, 42(24): 1–12.  
XU Y C, LIU H, WANG G Y, et al. Analysis of fungal community structure and dominant genus in stored rice based on high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2021, 42(24): 1–12.
- [12] WANG X H, WANG S H, ZHAO H. Unraveling microbial community diversity and succession of Chinese Sichuan sausages during spontaneous fermentation by high-throughput sequencing[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(151): 3254–3263.
- [13] YANG H Y, WU H, GAO L J, et al. Effects of *Lactobacillus curvatus* and *Leuconostoc mesenteroides* on Suancai fermentation in Northeast China[J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 26(12): 2148–2158.
- [14] BOLYEN E, RIDEOUT J R, DILLON M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 852–857.
- [15] MARCEL M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. EMBnet, 2011, 17(1): 10–12.
- [16] CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN ML J, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature Methods, 2016, 13(7): 581–583.
- [17] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 996–998.
- [18] URMAS K, HENRIK N R, KESSY A, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi[J]. Molecular Ecology, 2013, 22(21): 5271–5277.
- [19] BOKULICH N A, KAEHLER B D, RAM R J, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with qiime 2's q2-feature-classifier plugin[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 1–17.
- [20] 冯晓娟, 李文祥. 核桃仁霉烂病发生原因及防治措施[J]. 农业科技与信息, 2009(3): 38.  
FENG X J, LI W X. Causes and control measures of walnut mildew disease[J]. Agricultural Science & Technology and Information, 2009(3): 38.
- [21] 李亚婷. 霉菌对核桃仁油脂哈败的影响研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.  
LI Y T. Study on the effect of mold on oil and fat of walnut [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2017.
- [22] 邓盈盈. 低热量功能性油脂的开发[D]. 天津: 天津大学, 2013.  
DENG Y Y. Development of low calorie functional oils[D]. Tianjin: Tianjin University, 2013.
- [23] LEONEL M, RAQUEL V, KERSTIN V, et al. Human fungal pathogens of *Mucorales* and *Entomophthorales* [J]. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2015, 5(4): 1–33.
- [24] MARYAM A, MAHMOOD G. Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage[J]. Food Science and Technology, 2016, 73(1): 178–184.
- [25] 邢少峰. 环境微生物群落结构与功能多样性研究方法[J]. 生物技术世界, 2015(2): 3.  
XING S F. Research methods on structure and functional diversity of environmental microbial community[J]. Biotechnology World, 2015(2): 3.
- [26] 胥伟, 姜依何, 吴丹, 等. 高通量测序研究霉变黑毛茶的真菌多样性[J]. 茶叶科学, 2017, 37(5): 483–492.  
XU W, JIANG Y H, WU D, et al. Study on fungal diversity of mildewed hairy tea by high-throughput sequencing[J]. Tea Science, 2017, 37(5): 483–



- 492.
- [27] 程功, 张国财, 张欣倩, 等. 利用植物内生真菌防治植物病害的探讨[J]. 中国林副特产, 2010(5): 91-94.
- CHENG G, ZHANG G C, ZHANG X Q, et al. Application of endophytic fungi to control plant diseases[J]. Forest Products of China, 2010(5): 91-94.
- [28] 康振生, 黄丽丽. 禾谷镰刀菌在小麦穗部侵染过程的细胞学研究[J]. 植物病理学报, 2004, 34(4): 329-335.
- KANG Z S, HUANG L L. Cytological study of *Fusarium gramineis* infection in wheat ear[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(4): 329-335.
- [29] KING B C, WAXMN K D, NENNI N V, et al. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 4(1): 1-14.
- [30] BANI M, RISPAL N, EVIDENTE A, et al. Identification of the main toxins isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2 and their relation with isolates pathogenicity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(12): 2574-2580.
- [31] 崔云凤, 黄云, 蒋伶俐. 农业生产上几种重要的赤霉属真菌研究进展[J]. 中国农学通报, 2007(7): 441-446.
- CUI Y F, HUANG Y, JIANG L H. Research progress of several important *Gibberellosis fungi* in agricultural production[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007(7): 441-446.
- [32] 满燕, 梁刚, 李安, 等. 链格孢霉毒素检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 453-458.
- MAN Y, LIANG G, LI A, et al. Research progress of detecting methods for *Alternaria* toxins[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(2): 453-458.
- [33] FAKRUDDIN M D, CHOWDHURY A, HOSSAIN M N, et al. Characterization of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* from food and feed samples[J]. SpringerPlus, 2015, 4(1): 1-6.
- [34] MAHMOUD M A, ALI H M, EL-AZIZ A R M, et al. Molecular characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates collected from corn grains[J]. Genetics and Molecular Research: GMR, 2014, 13(4): 9352-9370.
- [35] YANG K, ZHUANG Z H, ZHANG F, et al. Inhibition of aflatoxin metabolism and growth of *Aspergillus flavus* in liquid culture by a DNA methylation inhibitor[J]. Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 2015, 32(4): 554-563.
- [36] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量: GB 2761-2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. National standard for food safety limits of mycotoxins in food: GB 2761-2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [37] 耿阳阳, 徐俐, 吴光慧. 鲜食核桃贮藏期主要真菌病害分离及抑制[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 197-201.
- GENG Y Y, XU L, WU G H. Isolation and inhibition of main fungal diseases of fresh walnut during storage[J]. Food and Machinery, 2013, 29(6): 197-201.
- [38] WEI L, FU H, LIN M, et al. Identification of dominant fungal contamination of walnut in North-western China and effects of storage conditions on walnut kernels[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 264(1): 109-141.
- [39] 黄凯, 袁德保, 韩忠. 鲜食核桃贮藏中腐烂病原菌分离、鉴定及体外抑菌研究[J]. 食品工业科技, 2009, 7(1): 150-152.
- HUANG K, YUAN D B, HAN Z. Isolation, identification and *in vitro* bacteriostasis of rotten pathogens in fresh walnut storage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 7(1): 150-152.
- [40] 李勇鹏, 潘莉, 宁德鲁, 等. 冷藏期间鲜食核桃霉菌总数变化及主要种类鉴定[J]. 西部林业科学, 2021, 50(3): 87-91.
- LI Y P, PAN L, NING D L, et al. Total variation and main species identification of fresh edible walnut mould during cold storage[J]. Western Forestry Science, 2021, 50(3): 87-91.

## Analysis of Fungal Diversity of Moldy Walnut Kernel Based on High-throughput Sequencing Technology

Fang Yuan<sup>1</sup>, Su Gaoya<sup>2</sup>, Wang Weixiong<sup>3</sup>, Bai Yongchao<sup>2</sup>, Wang Fengjun<sup>1\*</sup>, Pei Dong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, Beijing Key Laboratory of Forest Processing and Safety, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Silviculture of the State Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091

<sup>3</sup>College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

**Abstract** Objective: To reveal the changes of fungal community structure and diversity in walnut the potential health threats during natural mildew through studying the fungal infection process of walnut during natural mildew. Methods: The fungal ITS rDNA of fresh walnut kernel samples with different mildew time was sequenced by Illumina Miseq high-throughput sequencing technique, and the changes of fungal community composition and diversity in the process of fresh walnut kernel mildew were analyzed. Results: Ascomycota is the main fungal species in the mildew process of walnut samples, with a relative abundance of 27.41%–99.98%, followed by Basidiomycota with a relative abundance of 0.01%–32.56%. At the fungal level, it was found that the main dominant populations in the mildew process were *Fusarium*, *Alternaria*, *Gibberella* and *Aspergillus*. The mildew process of walnut in a week can be divided into three periods: Period I (0–2 days), Period II (3–4 days) and Period III (5–7 days). In stages of Period I and Period II, *Fusarium* was the dominant genus, and the main fungus that change significantly among other periods were *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Gibberella* and *Penicillium*. Conclusion: The changes of fungal microbial community during mildew of walnut could be divided into three periods, during which the fungal diversity showed a downward trend, and there were a variety of harmful pathogens, such as *Fusarium* and *Aspergillus*, etc., which might cause potential safety risks if not handled properly.

**Keywords** walnut; mildew; fungi; high-throughput sequencing; fungal community diversity