

基于DNA宏条形码技术的中药材苦杏仁表面真菌多样性研究

郭梦月^{1,2}, 于景盛^{1,2}, 姜汶君^{1,2}, 庞晓慧^{1,2*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 中药资源教育部工程研究中心, 北京 100193)

摘要: 苦杏仁为药食两用品种, 因其富含油脂等营养物质而易受到真菌污染。本研究基于DNA宏条形码技术对苦杏仁中污染真菌的多样性进行分析, 为其安全使用提供参考依据。收集来自4个药材市场和3种炮制规格的苦杏仁样品共12批, 提取真菌DNA并扩增ITS2序列, 基于Illumina MiSeq PE300平台进行高通量测序。结果表明子囊菌门Ascomycota是苦杏仁污染真菌中的最优势菌群。在属水平, 除样品SW1_P中最优势菌群为*Diutina*外, 其余样品中最优势菌群均为曲霉属*Aspergillus*。共准确鉴定到3种有害真菌, 分别是黄曲霉*Aspergillus flavus*、*Wallemia sebi*和少根根霉*Rhizopus arrhizus*。此外, 不同收集地的苦杏仁样品中葡萄座腔菌目Botryosphaerales和链格孢属*Alternaria*的相对丰度存在显著差异, 不同炮制规格的苦杏仁样品中肉座菌目Hypocreales和枝孢属*Cladosporium*的相对丰度存在显著差异。综上, DNA宏条形码技术可有效阐明中药苦杏仁中污染真菌多样性, 快速检测药材中潜在产毒真菌, 为真菌毒素污染防控提供早期风险预警。

关键词: 苦杏仁; DNA宏条形码; 高通量测序; 真菌多样性; ITS2

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)08-2295-07

Analysis of fungal diversity on the surface of Armeniaca Semen Amarum using a DNA metabarcoding technique

GUO Meng-yue^{1,2}, YU Jing-sheng^{1,2}, JIANG Wen-jun^{1,2}, PANG Xiao-hui^{1,2*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Engineering Research Center of Chinese Medicine Resources, Ministry of Education, Beijing 100193, China)

Abstract: Medicinal and edible Armeniaca Semen Amarum (ASA) is susceptible to fungal contamination because it is rich in oil and other nutrients. In this study, the fungal community diversity in ASA samples was analyzed based on a DNA metabarcoding technique to provide evidence for its safe use. Twelve batches of ASA samples from four medicinal material markets and three processing approaches were collected. Total DNA was extracted, the ITS2 sequences were amplified, and high-throughput sequencing was performed using the Illumina MiSeq PE300 platform. The results show that Ascomycota was the most dominant fungus in ASA samples. The predominant genus in sample SW1_P was *Diutina*, whereas the most predominant genus in the other samples was *Aspergillus*. Three harmful fungi were identified, namely, *Aspergillus flavus*, *Wallemia sebi*, and *Rhizopus arrhizus*. In addition, significant differences were observed in the relative abundance of Botryosphaerales and *Alternaria* in ASA samples from different collection sites. Meanwhile, there were significant differences in the relative abundance of Hypocreales and *Cladosporium* in ASA samples from different processing approaches. In summary, the DNA metabarcoding technique can effectively clarify the fungal community diversity and quickly detect potential toxigenic

收稿日期: 2021-01-22; 修回日期: 2021-03-19.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2017-I2M-1-013).

*通讯作者 Tel: 86-10-57833051, E-mail: xhpang@implad.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0119

fungi in ASA samples, thus providing a warning for mycotoxin contamination.

Key words: Armeniaceae Semen Amarum; DNA metabarcoding; high-throughput sequencing; fungal diversity; ITS2

苦杏仁 (Armeniaceae Semen Amarum, ASA) 始载于《神农本草经》, 是药食两用品种。其来源于蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim.、西伯利亚杏 *P. sibirica* L.、东北杏 *P. mandshurica* (Maxim.) Koehne 或杏 *P. armeniaca* L. 的干燥成熟种子, 具有降气止咳平喘、润肠通便的功效, 用于治疗咳嗽气喘、胸满痰多、肠燥便秘^[1]。现代研究表明苦杏仁中的化学成分为苦杏仁苷、脂肪、纤维素、蛋白质和糖类等^[2], 具有免疫调节、抗炎镇痛、抗肿瘤和抗纤维化等药理作用^[3]。在新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 的临床治疗中, 苦杏仁是最常用的中药之一^[4]。

黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AF) 是中药材中常见的污染真菌毒素之一, 主要包括 B₁、B₂、G₁、G₂ 四种, 其中 B₁ 的毒性最强, 对人类健康造成严重威胁^[5]。苦杏仁富含油脂等丰富的营养物质, 其在采收、加工和贮藏等多个环节中容易污染真菌而发生霉变, 在适宜条件下所污染的产毒真菌还会产生真菌毒素。有报道苦杏仁中污染真菌和黄曲霉毒素严重, 且有样品检测出 AFB₁ 超过限量标准^[6,7], 威胁到临床用药安全。此外, 不同炮制规格的苦杏仁样品污染黄曲霉毒素情况存在差异, 研究表明去种皮的苦杏仁比未去种皮的苦杏仁更容易污染黄曲霉毒素^[8]。因此, 有必要对中药材苦杏仁中污染真菌进行快速准确鉴定, 为药材安全使用提供风险预警。

Taberlet 等^[9]于 2012 年提出了 DNA 宏条形码 (DNA metabarcoding) 的概念, 即对环境样本 (土壤、水、粪便等) 中提取的总 DNA 和典型的降解 DNA 进行高通量测序, 实现多物种 (或更高水平分类单元) 的鉴定。在高通量测序技术和生物信息学分析手段的有力支持下, DNA 宏条形码技术使混合样品中多物种的分类鉴定成为可能^[9]。近年来, 该技术已广泛应用于微生物群落多样性分析中^[10-12], 为中药材污染真菌多样性分析提供了新的思路。本研究应用 DNA 宏条形码技术对不同收集地和不同炮制规格的苦杏仁中污染真菌多样性进行分析, 为其安全使用提供参考依据。

材料与方 法

材料 从河北安国、安徽亳州和成都荷花池 3 个药材市场收集生苦杏仁、燻苦杏仁和炒苦杏仁 3 种规格

的药材各 2 批。将燻苦杏仁样品按照不同收集地分为 AG (安国)、BZ (亳州)、HH (荷花池)、SW (舜王城) 4 组, 并将收集于舜王城药材市场的样品按照不同炮制规格分为 P (燻苦杏仁)、C (炒苦杏仁)、S (生苦杏仁) 3 组 (表 1)。

Table 1 Voucher information for the Armeniaceae Semen Amarum (ASA) samples in this study

Voucher number	Collection site	Collection time	Group name 1	Group name 2
AG1	Anguo, Hebei	2020.09	AG	/
AG2	Anguo, Hebei	2020.09	AG	/
BZ1	Bozhou, Anhui	2020.09	BZ	/
BZ2	Bozhou, Anhui	2020.09	BZ	/
HH1	Chengdu, Sichuan	2020.09	HH	/
HH2	Chengdu, Sichuan	2020.09	HH	/
SW1_P	Heze, Shandong	2020.09	SW	P
SW2_P	Heze, Shandong	2020.09	SW	P
SW1_C	Heze, Shandong	2020.09	/	C
SW2_C	Heze, Shandong	2020.09	/	C
SW1_S	Heze, Shandong	2020.09	/	S
SW2_S	Heze, Shandong	2020.09	/	S

DNA 提取 称取约 5 g 苦杏仁样品于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS), 涡旋振摇 5 min, 用单层无菌纱布进行过滤, 滤液用高速冷冻离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司, 中国, 型号: 3H20RI) 以最大转速离心 20 min 获得微生物。根据 EZNA[®] 土壤 DNA 提取试剂盒 (Omega 公司, 美国, 型号: D5625-01) 说明书提取微生物总 DNA。

PCR 扩增和高通量测序 提取所获 DNA 经检验合格后, 扩增真菌 ITS2 序列, 扩增引物为 ITS3F (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') 和 ITS4R (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3')^[13]。PCR 扩增体系为 20 μL: 5×FastPfu Buffer 4 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 2 μL, 正反向引物各 0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL, BSA 0.2 μL, 模板 DNA 10 ng, 加 ddH₂O 补足。PCR 扩增程序如下: 95 °C 变性 3 min; 再进行 35 个循环 (95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s); 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物取 3 μL 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen 公司, 美国) 切胶回收 PCR 产物, Tris-HCl 洗脱; 2% 琼脂糖电泳检测。采用 Illumina MiSeq PE300 测序平台对 PCR 产物进行高通量测序。

数据分析 采用 Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME, version 1.9.1, <http://qiime.org>) 软件对测得的 fq 数据进行过滤处理^[14]。利用 UPARSE (version 7.1, <http://drive5.com/uparse/>)^[15] 基于 97% 的相似度水平对所有序列进行 OTU 聚类, 使用 USEARCH (version 8.1.1861, <http://www.drive5.com/usearch/>)^[16] 去除嵌合体。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 OTU 代表序列进行分类学分析, 基于 UNITE 8.0 数据库^[17] 在界、门、纲、目、科、属和种水平注释群落物种信息。基于国际核苷酸序列数据库 (International Nucleotide Sequence Database, INSD), 以 100% 序列相似性为标准, 通过手动 BLAST 对总丰度前 20 的 OTU 在种水平的分类进行验证。利用 mothur^[18] 进行稀释性曲线 (rarefaction curve) 分析, 使用 Venn 图统计不同分组样本中共有和独有 OTU 数目。采用 Chao 1、Ace、Shannon、Simpson 指数来估计群落的 Alpha 多样性。基于主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA) 阐明不同样本组成的相似性。选用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 比较不同分组样品中真菌群落分布在不同分类水平是否存在显著性差异。利用 R 语言工具制作曲线图。

结果

1 苦杏仁中真菌多样性分析

质控后, 各样本中有效 ITS2 序列为 51 624~73 468 条, 总序列数为 780 218 条, 平均序列长度为 349 bp。稀释性曲线分析图中所有样品几乎平行于 x 轴, 表明获得的 reads 数量足以代表总体真菌群落多样性 (图 1)。剔除非真菌 OTU 后, 在 12 份苦杏仁样品中共获得 262 个 OTU。4 个药材市场的燂苦杏仁样品中共有 OTU 为 43 个, 独有 OTU 分别为 11、35、45 和 5 个。荷花池药

材市场样品的 OTU 数量最多, 而舜王城药材市场样品的 OTU 数量最少 (图 2a)。在来源于舜王城药材市场的 3 种不同炮制规格样品中共有 OTU 为 45 个, 独有 OTU 分别为 56、5 和 18 个。生苦杏仁样品中 OTU 数量最多, 而燂苦杏仁样品中 OTU 数量最少 (图 2b)。基于 Chao 1、Ace、Shannon、Simpson 指数来估计群落的 Alpha 多样性, 其中 Chao1 和 Ace 用来反映样品中群落丰富度, Shannon 和 Simpson 用来反映样品中群落多样性。样品 SW1_S 和 SW2_P 分别具有最高的 Chao1 和 Ace 指数, 物种丰富度最高。样品 HH1 Shannon 指数最高且 Simpson 指数最低, 物种多样性最高 (表 2)。基于 Bray-Curtis 距离矩阵的 PCoA 分析的结果表明, 对于 4 个药材市场收集的燂苦杏仁样品, 同一收集地的两样本物种组成更为相似 (图 3a)。类似地, 舜王城药材市场所收集样本中相同炮制规格的两样本物种组成更为相似 (图 3b)。

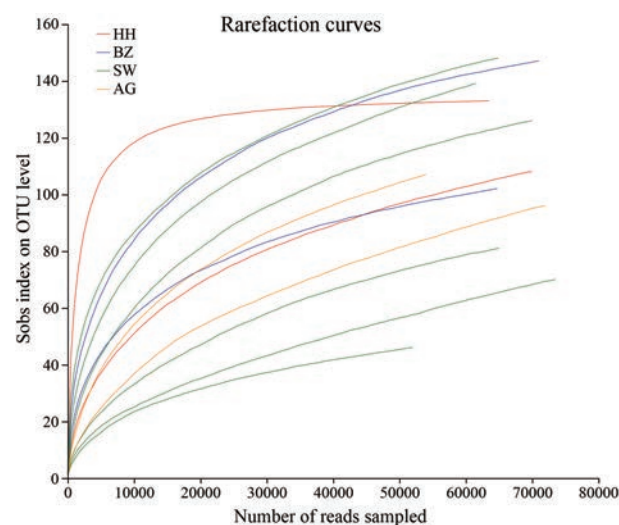


Figure 1 Rarefaction curves of OTUs for the ASA samples

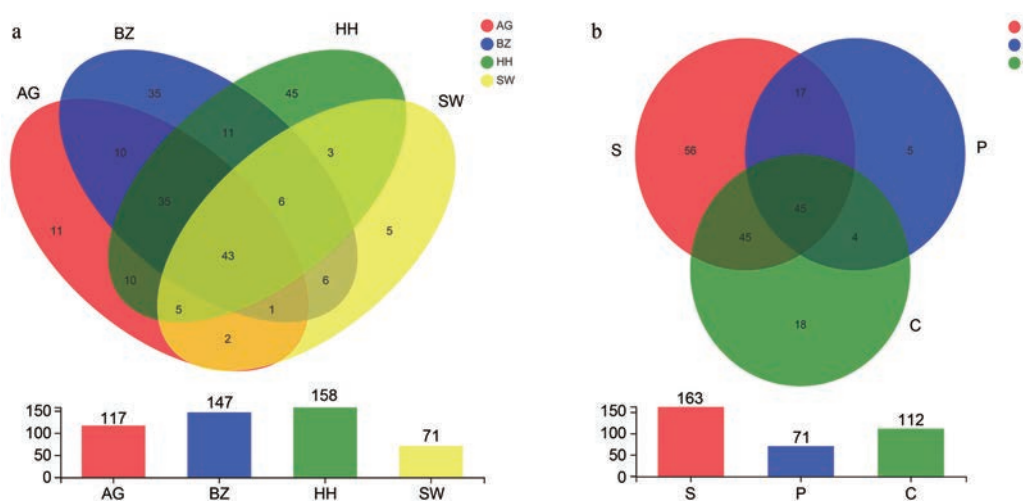


Figure 2 Venn diagram of OTUs in the ASA samples from different collection sites (a) and processing approaches (b)

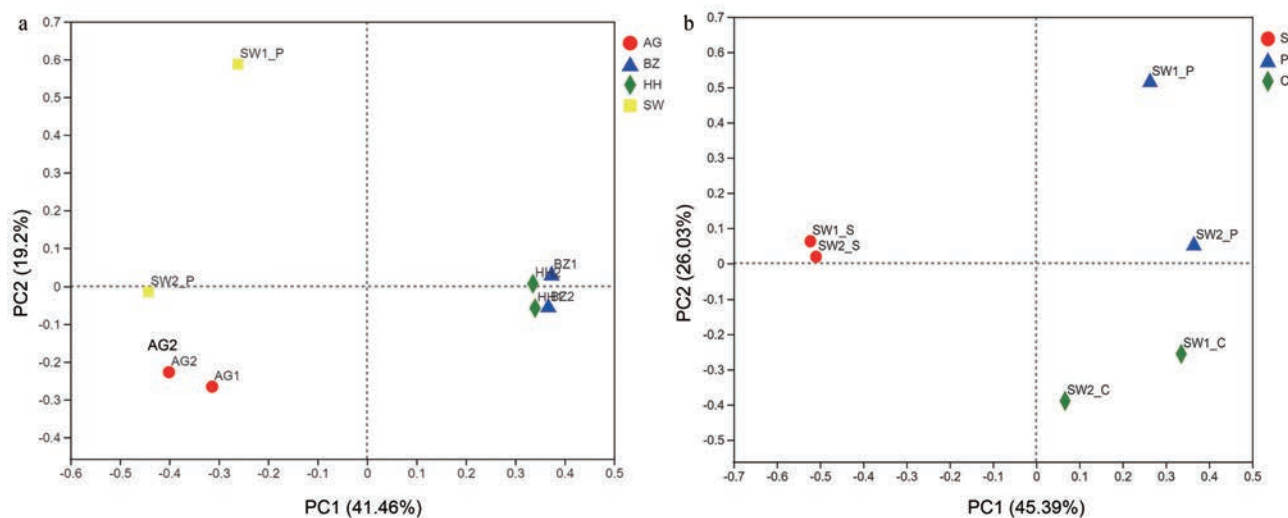


Figure 3 PCoA plots based on Bray-Curtis distance matrix in the ASA samples from different collection sites (a) and processing approaches (b)

Table 2 Alpha diversity of the fungal community in the ASA samples

Sample	Chao 1	Ace	Shannon	Simpson
AG1	126.0625	164.4211	2.774092	0.209669
AG2	126.46154	169.2456	2.791664	0.13285
BZ1	111	111.4567	1.442746	0.394549
BZ2	129.66667	134.6739	2.766603	0.128466
HH1	110	110.208	3.283578	0.078958
HH2	139.75	135.1389	0.954026	0.707005
SW1_P	53.75	80.46433	1.799311	0.340399
SW2_P	162.6	185.4233	2.801068	0.103319
SW1_C	91	92.79336	2.916722	0.096396
SW2_C	121	126.8236	2.633112	0.208136
SW1_S	181.92857	166.4617	1.229421	0.477945
SW2_S	159.35294	163.1008	2.196557	0.226085

2 苦杏仁中真菌组成分析

在4个药材市场收集的燂苦杏仁中,共检测到来源于5门16纲34目77科123属的真菌。在门水平,子囊菌门Ascomycota是最优势菌门(68.57%~99.20%),其次是担子菌门Basidiomycota(0.35%~28.63%)(图4a)。在纲水平,除样品SW1_P和HH1中最优势菌群分别为酵母纲Saccharomycetes(77.81%)和座囊菌纲Dothideomycetes(31.90%)外,散囊菌纲Eurotiomycetes(49.20%~94.54%)在其余样品中占据最优势地位。在目水平,除样品SW1_P中最优势菌群为酵母目Saccharomycetales(77.81%)外,其余样品中散囊菌目Eurotiales(27.31%~94.54%)相对丰度最高。在属水平,除样品SW1_P中最优势菌群为*Diatina*(70.07%)外,其他样品均以曲霉属*Aspergillus*(25.86%~93.86%)为最优势菌群。此外,*Kazachstania*(17.10%)和青霉属*Penicillium*(16.45%)是样品AG2中的优势属,节担菌属*Walleimia*(16.54%)和链格孢属*Alternaria*(11.83%)是样品HH1中的优势属,假囊酵母属*Eremothecium*

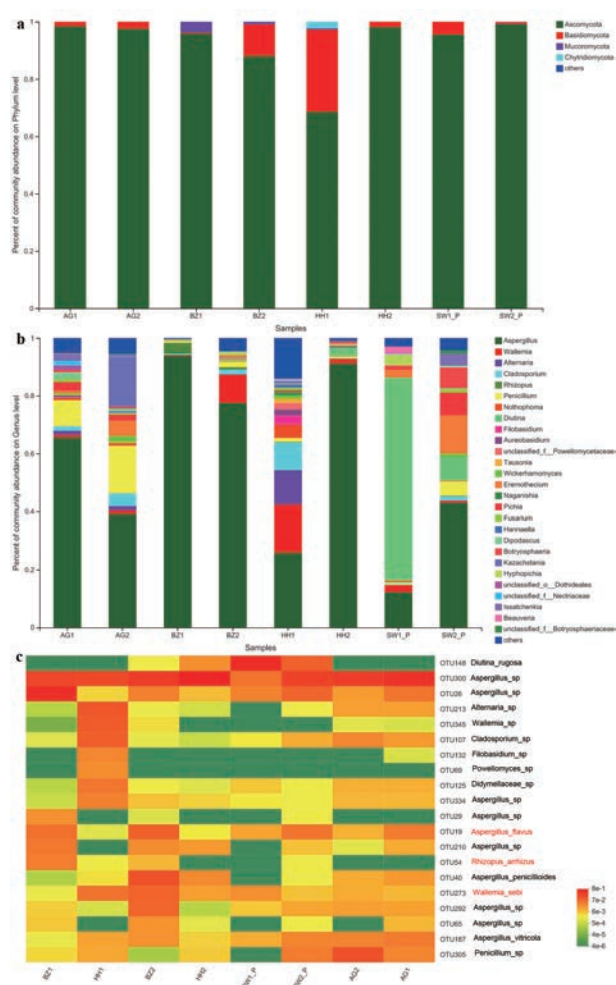


Figure 4 Fungal composition of the ASA samples from different collection sites at the phylum (a), genus (b), and OTU (c) levels

(13.20%)是样品SW2_P中的优势属(图4b)。共准确鉴定到3种有害真菌,分别是黄曲霉*Aspergillus flavus*(0.12%~9.06%)、*Walleimia sebi*(0.18%~7.88%)和少

根根霉 *Rhizopus arrhizus* (0~3.81%) (图 4c)。与其他 3 个药材市场相比, 亳州药材市场的燂苦杏仁药材中有害真菌总相对丰度更高。

在源自舜王城药材市场的 3 种炮制规格样品中, 检测到来自 3 门 11 纲 28 目 61 科 95 属的真菌。在门水平, 子囊菌门 Ascomycota 是最优势菌门 (86.29%~99.65%), 其次是担子菌门 Basidiomycota (0.35%~13.09%) (图 5a)。在纲和目水平, 除样品 SW1_P 中最优势菌群为酵母纲 Saccharomycetes (77.81%) 和酵母目 Saccharomycetales (77.81%) 外, 散囊菌纲 Eurotiomycetes (49.20%~94.53%) 和散囊菌目 Eurotiales (49.00%~94.49%) 在其余样品中占据最优势地位。在科水平, 除样品 SW1_P 外, 其余样品中曲霉科 Aspergillaceae 相对丰度最高 (48.00%~94.44%)。在属水平, 除样品 SW1_P 中最优势菌群为 *Diutina* (70.07%) 外, 其他样品以曲霉属 *Aspergillus* (43.00%~91.22%) 为最优势菌群。此外, 与生苦杏仁样品相比, 燂苦杏仁样品中 *Diutina* 和假囊酵母属 *Eremothecium* 相对丰度更高, 炒苦杏仁样品中

节担菌属 *Wallemia*、青霉属 *Penicillium*、枝孢属 *Cladosporium* 和双足囊菌属 *Dipodascus* 相对丰度更高 (图 5b)。共准确鉴定到 2 种有害真菌, 分别是黄曲霉 *Aspergillus flavus* (0.05%~16.42%) 和 *Wallemia sebi* (0.26%~7.15%)。与生苦杏仁相比, 燂苦杏仁和炒苦杏仁中的黄曲霉相对丰度更高 (图 5c)。

3 苦杏仁中真菌组成差异分析

单因素方差分析结果表明, 收集于 4 个药材市场的燂苦杏仁中真菌群落在目水平和属水平均存在显著差异。舜王城药材市场样品中葡萄座腔菌目 Botryosphaeriales 的相对丰度显著高于其他药材市场的样品 (图 6a), 荷花池药材市场样品中链格孢属 *Alternaria* 的相对丰度显著高于其他药材市场的样品 (图 6b)。

此外, 舜王城药材市场 3 种不同炮制规格的样品中真菌群落在目水平和属水平上也存在显著差异。在目水平, 炒苦杏仁样品中煤食目 Capnodiales 的相对丰度显著高于生苦杏仁和燂苦杏仁, 而燂苦杏仁样品中肉座菌目 Hypocreales 的相对丰度显著高于生苦杏仁和炒苦杏仁 (图 7a)。在属水平, 炒苦杏仁样品中枝孢属 *Cladosporium* 的相对丰度显著高于生苦杏仁和燂苦杏仁 (图 7b)。

讨论

真菌在空气中普遍存在, 是常见的外源污染物之一, 威胁到药材的安全使用。近年来, 中药污染真菌和真菌毒素的现象多有报道, 引发国内外的广泛关注。使用被污染药材会对消费者生命健康造成潜在威胁, 对药材中污染真菌进行快速准确检测显得尤为必要。基于高通量测序的 DNA 宏条形码技术不需分离培养菌株, 弥补了传统方法中部分菌株不能分离培养的缺陷, 能更加全面反映药材中真菌群落多样性^[19]。本课题组前期探索了利用 DNA 宏条形码技术研究中药中污染真菌多样性的可行性, 发现该技术可实现中药中污染真菌的高效鉴定^[20-23]。本研究通过对苦杏仁药材污染真菌的鉴定验证了 DNA 宏条形码技术对中药污染真菌检测的适用性。前期研究中发现发霉与未发霉的酸枣仁、不同产地与市场的肉豆蔻、不同炮制规格的决明子及污染黄曲霉毒素与未污染黄曲霉毒素的柏子仁药材中污染真菌群落均存在显著差异^[20-23]。在本研究中, 来源于不同收集地或不同炮制规格的苦杏仁样品根据分组进行了明显聚类且其真菌群落组成在目水平和属水平均存在显著差异, 说明收集地和炮制加工都是影响苦杏仁中污染真菌群落多样性的重要因素。

曲霉属、青霉属、镰刀菌属和链格孢属是中药中最常见的污染菌, 也是产生真菌毒素的重要菌属^[24-26]。

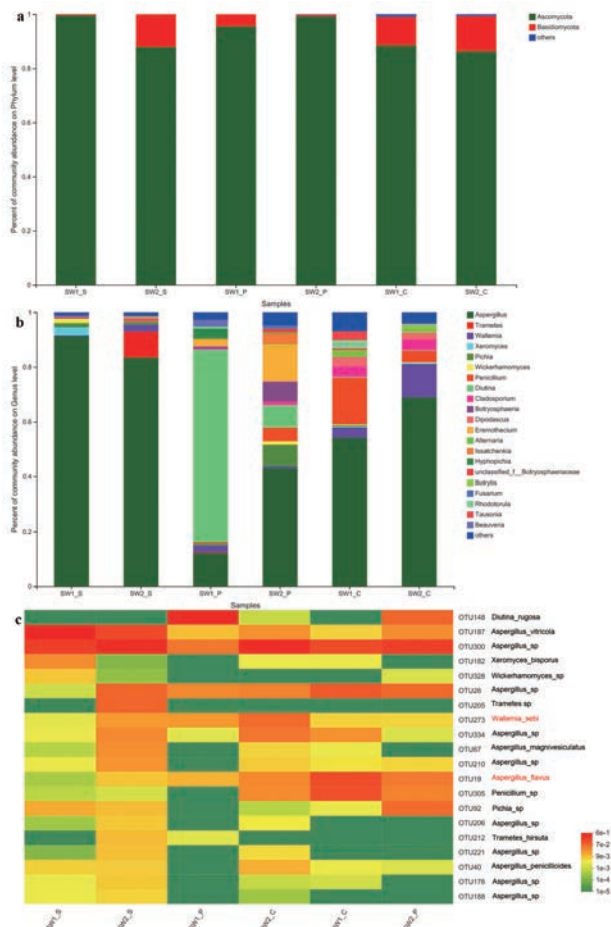


Figure 5 Fungal composition of the ASA samples from different processing approaches at the phylum (a), genus (b), and OTU (c) levels

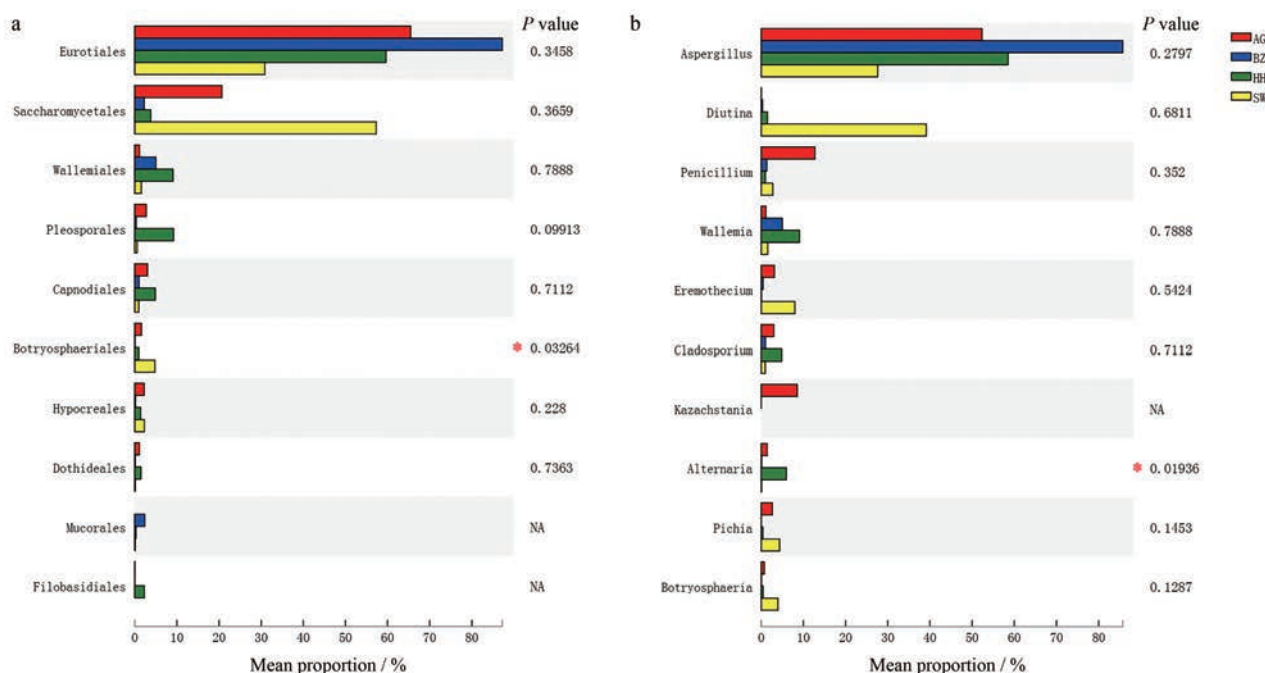


Figure 6 Significant difference among the ASA samples from different collection sites at the order (a) and genus (b) levels. Statistical analysis was performed by the one-way ANOVA method. * $P < 0.05$

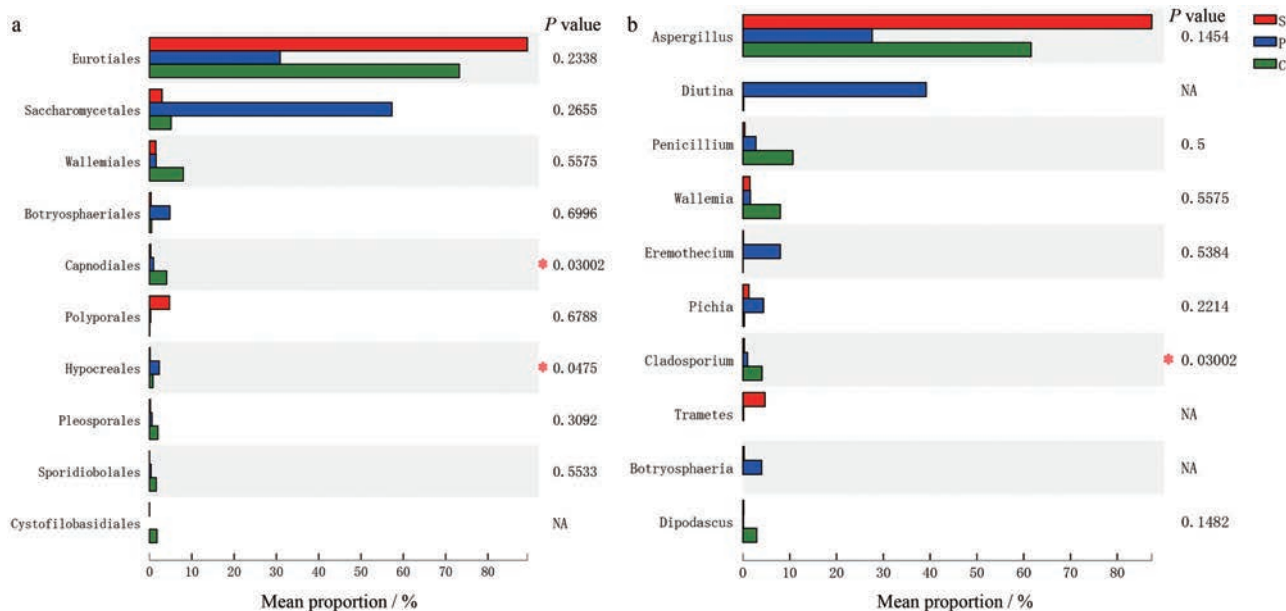


Figure 7 Significant difference among the ASA samples from different processing approaches at the order (a) and genus (b) levels. Statistical analysis was performed by the one-way ANOVA method. * $P < 0.05$

本研究表明苦杏仁样品中真菌污染情况普遍存在, 需要引起重视。在来自4个药材市场的焯苦杏仁样品中, 除样品 SW1_P 中最优势菌群为 *Diutina* 外, 其余样品中最优势菌群均为曲霉属。在来自安国药材市场和荷花池药材市场的样品 AG2 和 HH1 中, 也检测到相对丰度较高的青霉属、节担菌属和链格孢属真菌。此外, 在焯苦杏仁样品中检测到3种有害真菌, 每个样品中均存在至少2种有害真菌。亳州药材市场样品中有害真

菌的总相对丰度比其他3个药材市场的更高, 这可能是因为该地区的温度、湿度等环境条件更适合这些有害真菌生长和繁殖。在3种炮制规格的苦杏仁样品中, 除样品 SW1_P 外, 其他样品中相对丰度最高的菌群均为曲霉属。在炒苦杏仁样品中也检测到较为丰富的青霉属、节担菌属和枝孢属真菌。在不同炮制规格的苦杏仁样品中均检测到潜在产毒真菌黄曲霉, 焯苦杏仁和炒苦杏仁中的黄曲霉相对丰度比生苦杏仁更高, 这可能

是因为在去除种皮后,苦杏仁中的营养物质直接暴露,为黄曲霉的生长提供了更加适宜的生长和繁殖条件。

综上,DNA宏条形码技术为苦杏仁中污染真菌的检测提供了有效方法,阐明了不同收集地和炮制规格药材中真菌群落组成的差异,高效鉴定药材中潜在产毒真菌,可为防控真菌毒素污染提供早期风险预警。

作者贡献: 庞晓慧负责研究设计;郭梦月、于景盛和姜汶君负责实验操作和数据分析;郭梦月负责论文撰写;庞晓慧负责论文的审阅和修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典一部) [M]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 210.
- [2] Li K, Shi Q, Zhu H, et al. Chemical compositions in bitter almond [J]. J Northwest Forest Univ (西北林学院学报), 2004, 19: 124-126.
- [3] He X, Wu L, Wang W, et al. Amygdalin - a pharmacological and toxicological review [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 254: 112717.
- [4] Zhou Z, Gao N, Wang Y, et al. Clinical studies on the treatment of novel coronavirus pneumonia with traditional Chinese medicine - a literature analysis [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 560448.
- [5] Zhang L, Dou XW, Zhang C, et al. A review of current methods for analysis of mycotoxins in herbal medicines [J]. Toxins (Basel), 2018, 10: 65.
- [6] Tan J, Zheng R, Wang W, et al. Simultaneous determination of aflatoxins and zearalenone in Chinese crude drugs by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2012, 23: 2469-2472.
- [7] Wang W, Xu H, Chen H, et al. Separation and molecular identification of fungal contamination on surface of 15 Chinese herbal medicines [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 1910-1914.
- [8] Zheng R, Xu H, Wang W, et al. Determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ in Armeniacae Semen Amarum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 3534-3538.
- [9] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, et al. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding [J]. Mol Ecol, 2012, 21: 2045-2050.
- [10] Nilsson RH, Anslan S, Bahram M, et al. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17: 95-109.
- [11] López-Angulo J, de la Cruz M, Chacón-Labela J, et al. The role of root community attributes in predicting soil fungal and bacterial community patterns [J]. New Phytol, 2020, 228: 1070-1082.
- [12] Straumfors A, Foss OAH, Fuss J, et al. The inhalable mycobiome of sawmill workers: exposure characterization and diversity [J]. Appl Environ Microbiol, 2019, 85: e01448-19.
- [13] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M] // Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols a Guide to Methods and Applications. San Diego: Innis Academic, 1990: 315-322.
- [14] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nat Med, 2010, 7: 335-336.
- [15] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nat Methods, 2013, 10: 996-998.
- [16] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. Bioinformatics, 2010, 26: 2460-2461.
- [17] Nilsson RH, Larsson KH, Taylor AFS, et al. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47: D259-D264.
- [18] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75: 7537-7541.
- [19] Xia F, Chen X, Guo MY, et al. High-throughput sequencing-based analysis of endogenous fungal communities inhabiting the Chinese Cordyceps reveals unexpectedly high fungal diversity [J]. Sci Rep, 2016, 6: 33437.
- [20] Guo M, Jiang W, Luo J, et al. Analysis of the fungal community in Ziziphi Spinosa Semen through high-throughput sequencing [J]. Toxins (Basel), 2018, 10: 494.
- [21] Guo M, Jiang W, Yang M, et al. Characterizing fungal communities in medicinal and edible Cassia Semen using high-throughput sequencing [J]. Int J Food Microbiol, 2020, 319: 108496.
- [22] Jiang W, Guo M, Yang M, et al. High-throughput analysis of fungal communities in Myristica Semen [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 128: 109499.
- [23] Yu J, Guo M, Jiang W, et al. Assessment of the microbiome and potential aflatoxin associated with the medicinal herb *Platygladus orientalis* [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 582679.
- [24] Rocha-Miranda F, Venâncio A. Mycotoxigenic fungi in plant-based supplements and medicines [J]. Curr Opin Food Sci, 2019, 30: 27-31.
- [25] Su C, Hu Y, Gao D, et al. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins on root herbs from Chinese markets [J]. J Food Prot, 2018, 81: 754-761.
- [26] Li T, Jiang D, Hu X, et al. Study on the surface fungus diversity of commercially *Platygladi* semen based on high-throughput sequencing technology [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 2100-2105.