

四种嗜热真菌的分离与鉴定^{*}

蔡杰华^{1,2} 刘斌¹ 石冬梅² 彭万强³ 赖钧灼¹

(1 广西大学 生命科学与技术学院 广西南宁 530005; 2 安徽省蚌埠市固镇一中 安徽 蚌埠 233700;

3 安徽省蚌埠市固镇县中医院 安徽 蚌埠 233700)

摘要 目的 在对嗜热真菌的资源调查中,分离到嗜热真菌 20 株。方法 通过形态学比较研究并结合分子分析方法。结果 鉴定出嗜热真菌 4 种,即杜邦青霉 *Penicillium dupontii*、疏绵状嗜热丝孢菌 *Thermomyces lanuginosus*、嗜热子囊菌 *Thermoascus aurantiacus*、嗜热革节孢 *Scytalidium thermophilum*。此外,还分离到耐热真菌 1 种,鉴定为不规则头梗霉 *Cephalophora irregularis*,为中国新记录种。结论 这些研究结果新增了嗜热真菌在中国的分布记载,丰富了我国西南地区嗜热真菌的菌种资源库,另外对分离获得的嗜热真菌进行木聚糖酶活性测试,发现嗜热子囊菌为高产木聚糖酶活力的菌株。

关键词 嗜热真菌 分类 形态特征 分子鉴定

中图分类号 :Q949.32 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2012)06-1059-06

Isolation and Identification of Four Species of Thermophilic Fungi^{*}

CAI Jie-hua^{1,2}, LIU Bin¹, SHI Dong-mei², PENG Wan-qiang³, LAI Jun-zhuo¹

(1 College of Life Science and Technology, Guang University, Nanning 530005, China; 2 The first middle school of guzhen, BengBu, An Hui, 233700, China; 3 The Hospital of Traditional Chinese Medicine of guzhen, BengBu, An Hui, 233700, China)

ABSTRACT **Objective:** To investigate and identify the species of thermophilic fungi according to morphology characteristic and identification. **Methods:** The illustrated description of species was supplied. **Results:** Four species of thermophilic fungi were identified, among of them, including *Penicillium dupontii*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoascus aurantiacus* and *Scytalidium thermophilum*. One thermotolerant fungus was also isolated and identified, that is *Cephalophora irregularis*, which become new record for the first time in China. **Conclusion:** Among of the obtained strains, *Thermoascus aurantiacus* Gxu03 was the best strain producing the highest xylanase activity.

Key words: Thermophilic fungi; Taxonomy; Morphology characteristic; Identification

Chinese Library Classification(CLC): Q949.32 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)06-1059-06

前言

嗜热真菌(Thermophilic fungi)是自然界中一类能够在极端高温条件下生存的特殊真菌类群,其最低生长温度为 20℃或 20℃以上,最高生长温度为 50℃或 50℃以上。嗜热真菌在高温条件下具有独特的生存适应能力,并可产生嗜热木聚糖酶等特殊的代谢产物,因此它已经成为研究热稳定酶和生物进化的重要微生物来源。木聚糖酶广泛应用于食品、饲料、化工、制药等领域。目前木聚糖酶的生产菌种主要是中温菌,由于中温菌具有产酶慢,酶系比活力不高且耐热性能不强等缺点,限制了木聚糖酶的应用。嗜热真菌能够分泌耐热胞外木聚糖酶,而且酶活力强,具有更广阔的应用前景。本研究对中国西南地区的嗜热真菌进行调查、分离和鉴定,收集菌种资源并从中筛选出木聚糖酶高产菌株。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2007 年 5 月~2008 年 4 月,先后几次到南宁市及其周边

地区采集样品,采集物主要包括高温堆肥、木薯淀粉渣、木屑堆、朽木条、腐烂稻草、树叶、土壤等样品。采集方法主要根据采集物而定,堆肥样品自堆肥中心取样,最好是当堆肥中心温度达到 50℃以上时采集。土样采集时,先用洁净工具刮去土壤表层覆盖物,取离表层土壤深 0-10 cm 的土壤,同一采集点多处取样后再将其均匀混合,装入具有封口膜的塑料袋中,每份土样采集量为 20-50 克,并用记号笔在塑料袋上标明编号、土表植物、地点、采集时间。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200g,葡萄糖 20 g,琼脂 16 g,水 1000 ml,pH 自然。

酵母-胰蛋白胨-葡萄糖琼脂培养基培养基(YG) 酵母膏 3g,胰蛋白胨 5g,葡萄糖 5g,琼脂 20g,水 1000 ml,pH 自然。

孟加拉红培养基(RBA):蛋白胨 5.0 g,葡萄糖 10.0 g, KH₂PO₄ 1.0g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g,琼脂 20 g,孟加拉红 0.03 g,蒸馏水 1000 ml,pH 7.0。

1.3 主要仪器设备

生化培养箱,上海跃进医疗器械厂;电热恒温培养箱,上

^{*} 基金项目 国家自然科学基金项目(30860006) 广西大学科研基金项目(X081002)。

作者简介 蔡杰华(1982),女,研究生,主要研究方向 资源与环境微生物

Tel :13955205571 E-mail :caijiehua2008@163.com

(收稿日期:2011-08-30 接受日期:2011-09-23)

海跃进医疗器械厂; 往复式恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; 超净工作台, 苏州净化设备厂; PCR 仪, Thermo Electron Corporation; 电泳仪, 北京六一仪器厂; 酶标仪, 奥地利 TECAN 公司; 冷冻离心机, 中科院武汉科学仪器厂; 显微镜, OLYMPUS OPTICAL CO.; 灭菌锅, 上海博迅实业有限公司; 酸度计, 上海雷磁仪器厂; 超低温冰箱, 美国 FORMA 公司; 分析天平, 德国赛多利斯。

1.4 主要试剂

链霉素; 聚乙烯吡咯烷酮(PVP); 石英砂; Tris 饱和酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1); 氯仿: 异戊醇 (24:1); 75%乙醇; EB 溴化乙锭 (10 ng/ml); $5 \times$ Loading Buffer; DNA Marker; 琼脂糖。CTAB 提取 Buffer: 20 mM EDTA, 2% (V/W) CTAB, 100 mM Tris, pH 8.5, 1.4 M NaCl; $5 \times$ TBE 电泳缓冲液: 54 g Tris, 20 ml 0.5 mol/l EDTA (pH 8.0), 27.5 g 硼酸, 加双蒸水定容至 1000 ml。使用时将上述缓冲液稀释 10 倍, 使用浓度 $0.5 \times$ TBE; TE 缓冲液 (pH 8.0) (10 mM Tris HCl; 1 M EDTA)

1.5 菌种分离

将样品用无菌水稀释至 10^{-1} ~ 10^{-3} 稀释度, 吸取 0.1 ml 涂布于含有链霉素 30 μ g/ml 的无菌各分离培养基平板上, 用 Parafilm 封口膜封口后置于 50 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 3-10 d, 在培养过程中随时观察, 待平板上长出菌落, 移接到新的培养基上, 50 $^{\circ}$ C 下继续培养, 直到分离获得纯培养。也可直接把样品撒在含有链霉素 30 μ g/ml 的各分离培养基平板上, 50 $^{\circ}$ C 下培养, 形成菌落后采用相同方法分离。

将纯化后的菌种移接到新的 PDA 培养基上并置于 19 $^{\circ}$ C 下培养 3-10 天, 不生长者可判断为嗜热真菌, 生长者为耐热真菌。

1.6 形态学鉴定

对分离获得的菌株, 接种于 PDA 培养基平板上, 分别置于 30、40 和 50 $^{\circ}$ C 下培养, 观察菌落培养特征, 并按 Liu et al.^[1]方法进行玻片培养。具体为: 先用灭菌的打孔器在菌落边缘切取直径为 1 cm 的菌种块, 然后用灭菌的解剖刀将切取的菌种块置于无菌的载玻片上, 菌丝面既可朝上也可朝下, 最后盖上无菌盖玻片并将其置于无菌的 50 ml 塑料离心管内培养, 使其离心管的直径正好等于载玻片的宽度, 将其牢牢卡住。将其放入 50 $^{\circ}$ C 下进行培养 4~7 d, 为了防止菌种块失水过快, 可在离心管中放置无菌吸水棉球。待菌丝长好后, 取另一洁净的载玻片, 滴加一滴无菌水, 取下已长好菌丝体的盖玻片盖上, 即可在显微镜下对菌丝、分生孢子梗、分生孢子等形态特征进行观察、拍照和测量, 并查阅相关资料进行鉴定。如果要制成永久玻片, 可以乳酚油或乳酸酚棉兰染色剂作为浮载剂。

1.7 分子生物学鉴定

1.7.1 菌株来源 本研究分离鉴定的 4 株嗜热真菌。

1.7.2 菌体培养 菌体培养方法参见 Liu et al. 等方法。培养时先铺一层无菌的玻璃纸 (直径 5 cm) 在 PDA 平板上, 然后在玻璃纸上移接直径为 1 cm 的菌丝块, 根据不同菌株的生长速度培养, 待玻璃纸上长满菌丝后再用灭菌的解剖刀将菌丝体刮下, 置于 1.5 ml 离心管内用于提取 DNA 或冻存留待提取 DNA 用。

1.7.3 DNA 提取 参照 Doyle & Doyle^[2]方法并经修改后的步骤对 DNA 进行提取。具体步骤: 取刮下的新鲜菌丝体 10-50 mg

置于 1.5 ml 离心管中, 加入灭菌的石英砂和 0.01 g PVP, 先加入 100 μ l 65 的 CTAB 缓冲溶液, 用灭菌的磨砂玻璃棒研磨成匀浆, 再加入 500 μ l 相同 CTAB 缓冲溶液, 数次颠倒使之均匀混合, 置于 65 $^{\circ}$ C 水浴保温 0.5-1 h 待冷却后加入等体积 600 μ l 饱和酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 抽提; 离心 12000 rpm, 10 min, 再取上清液移转入另一离心管中, 重复抽提一次; 离心 12000 rpm, 10 min, 取上清液加入等体积异丙醇, 混合均匀, 室温放置 10-20 min; 离心 (12000 rpm, 15 min), 去上清液; 取 75%乙醇 100 μ l 洗涤两次, 再倒去 75%乙醇, 风干后加入 100 μ l TE 缓冲液; 产物与 $6 \times$ Loading Buffer 混合, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.7.4 PCR 扩增 1) 引物合成: 扩增和测序所用的引物 ITS1, ITS4 由北京诺赛生物技术公司合成。

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

2) 扩增反应体系: 为 40 μ l 体系, 依次加入下列试剂: dd H₂O (30.4 μ l), Buffer (10 $\times$) (4 μ l), ITS1 (10 pmol/ μ l) (1.2 μ l), ITS2 (10 pmol/ μ l) (1.2 μ l), dNTP (2.5 mM) (2 μ l), Taq 酶 (5 U/ μ l) (0.4 μ l), 模板 DNA (0.8 μ l)。

3) 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min 后, 进入以下连续 30 个循环: 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

4) PCR 产物纯化: 用 1% 的琼脂糖凝胶检测扩增产物, 产物表现为单一条带且浓度足够者, 再进一步纯化, 采用北京诺赛公司 Go3S 柱式 PCR 产物纯化试剂盒, 按说明书的要求进行操作。

1.7.5 序列测定及序列分析 将纯化的 PCR 产物直接送北京诺赛生物技术公司, 用美国 PE 公司生产的 377 或 3730 型 DNA 测序仪进行序列测定。先用引物 ITS1 正向测定, 对正向无法测通的片段再用反向引物再测, 反向序列经 BioEdit 软件反向互补后与正向序列进行连接形成完整序列, 并与 GenBank 中的相关序列进行比对和分析比较。

2 结果

2.1 形态学鉴定结果

通过对筛选的菌株进行形态学鉴定, 共获得了 4 种嗜热真菌和 1 种耐热真菌, 分别编号为 Gxu01~Gxu05。

2.1.1 Gxu01: 杜邦青霉 (*Penicillium duportii* Griffon^[17] & Maublanc, Bulletin Trimestriel Soc. Mycol. France 27: 73, 1911)

在 PDA 培养基上 30 $^{\circ}$ C 下培养, 菌落无生长现象, 40 $^{\circ}$ C 生长缓慢。50 $^{\circ}$ C 菌落生长较快, 菌落初期呈白色毡状, 后期变为青灰色。菌丝无色, 壁光滑, 具分隔, 分隔处偶有膨大现象, 直径 2~3 μ m; 分生孢子梗一般垂直单生于菌丝上, 较短, 无隔, 8~14 $\times$ 2~3.5 μ m, 帚状枝, 一般有 1~6 个瓶梗组成, 偶见单生。瓶梗大小为 6~11 $\times$ 1~2.5 μ m; 分生孢子椭圆形, 链生, 初无色, 渐转为淡黄色, 2~4 $\times$ 2~3 μ m。

研究菌株 Gxu01, 通过形态学鉴定属于杜邦青霉 (*Penicillium duportii* Griffon & Maublanc, Bulletin Trimestriel Soc. Mycol. France 27: 73, 1911) 该菌株 2008 年 7 月分离自高温堆肥, 广西南宁市。

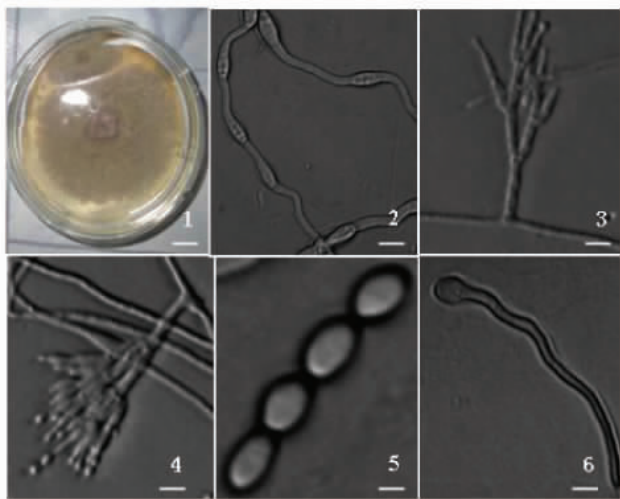


图1 杜邦青霉 1 菌落 2 菌丝 3~4. 分生孢子梗; 5. 链状分生孢子; 6. 萌发的分生孢子; 标尺 10 μm

Fig.1 *Penicillium duportii* 1. Colonial 2. Hyphae 3-4. Conidiophores; 5. Conidia; 6. Germinating conidia; Bars: 10 μm

讨论 该菌是一个世界广泛分布的嗜热真菌, 主要存于堆

肥、动物粪便、枯枝落叶等, 法国、以色列、南非、印度、日本、美国等国家已有报道。王冬梅和李多川从我国云南的昆明和大理分离到该菌。1965年 Stolk 首次发现并描述该菌的有性型, 即 *Talaromyces thermophilus* Stolk^[3-4]。该菌的有性阶段不常发生, Griffon & Maublanc 早在 1911 年就描述了无性型, 在无性型被发现半个世纪后其有性型才被发现。我们在培养该菌时也未观察到其有性型。因此, 该菌的鉴定主要根据无性阶段的形态特征。

2.1.2 Gxu02 疏棉状嗜热丝孢菌 (*Thermomyces lanuginosus* Tsiklinskaya^[13-15], Ann. Inst. Pasteur, Paris. 113: 500-505, 1899)

图2在PDA培养基上菌落生长迅速, 2天直径可达5cm。菌落初期呈白色, 逐步绿灰、黑色; 菌丝纤细, 无色, 分隔, 直径1.5~4 μm , 菌丝体为疏棉状; 产孢细胞为膨大的柄细胞, 无色, 不分枝, 长8~15 μm , 中间粗, 两端渐细, 基部宽1~2.0 μm , 顶部宽2~3.5 μm , 垂直侧生, 具隔膜, 隔膜处常缢缩; 分生孢子单生于分生孢子梗顶端, 球形, 壁厚, 幼时无色, 表面光滑, 不具隔膜, 成熟后表面出现刺状突起, 黑棕色, 直径8~10 μm , 成熟后的分生孢子极易脱落, 脱落时常带有一段很短的小柄。

研究菌株 Gxu02, 通过形态学鉴定属于疏棉状嗜热丝孢

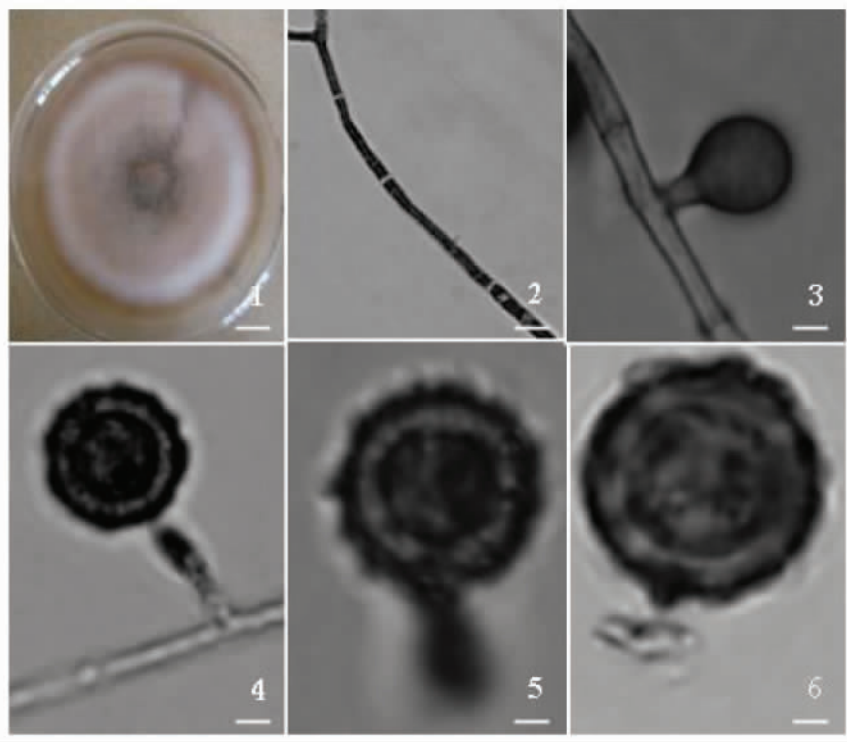


图2 疏棉状嗜热丝孢菌 1 菌落 2 菌丝 3~4. 分生孢子梗; 5~6. 分生孢子; 标尺 10 μm

Fig.2 *Thermomyces lanuginosus* 1. Colonial; 2. hyphae 3~4. Conidiophores 5~6. Conidia; Bars: 10 μm

菌 (*Thermomyces lanuginosus* Tsiklinskaya, Ann. Inst. Pasteur, Paris. 113: 500-505, 1899), 该菌株 2008 年 6 月分离自高温堆肥, 广西南宁市。

讨论 疏棉状嗜热丝孢菌最早由 Tsiklinskaya 于 1899 年描述, 是一个分布极为广泛的嗜热真菌。由于早期文献交流的缺乏, 造成该种多次被重复描述, 先后有 *Humicola lanuginosa* Griffon & Maublanc^[12-13]、*Sepedonium lanuginosum* (Miehe)^[16] Griffon & Maublanc、*Monotospora lanuginosa* (Griffon and

Maublanc) Mason 等多个同种异名。

2.1.3 Gxu03 嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus* Miehe Die Selbsterhitzung des Heues, 1907, 70) 在 PDA 培养基上 50 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 菌落生长迅速, 2-3 d 菌落直径达 9 cm, 而 30 $^{\circ}\text{C}$ 下则不生长。培养初期菌丝白色, 呈稀疏网状, 3 d 后, 菌落表面有白色颗粒状出现, 渐转为金黄色至锈棕色, 5~6 d 左右产生黄色或者棕色的水珠状的分泌物; 菌丝无色, 光滑, 具分枝和隔膜, 直径 2~11 μm ; 分生孢子位于菌丝的末端, 厚壁, 光滑, 瘤状, 长

14.0~24.0 μm , 宽 6.0~16.0 μm , 闭囊壳单生或簇生, 球形或不规则状, 黄棕色, 直径为 365~900 μm , 外壁由多层拟薄壁细胞组成; 子囊簇生于子囊盘中, 卵圆形至球形、壁薄、易消解; 子囊孢子卵圆形至椭圆形、壁光滑, 4.0~5.0 $\times$ 4.0~7.0 μm 。

研究菌株 Gxu03, 通过形态学鉴定属于嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus* Miele Die Selbsterhitzung des Heues, 1907, 70), 该菌株 2008 年 9 月分离自高温堆肥和土壤, 广西南宁市。

讨论: 该菌由 Miele 于 1907 年从自发热的草堆中分离并描述, Sopp 以 *Dactylomyces thermophilus* 为模式建立的新属

Dactylomyces 被处理为 *Thermoascus* 的异名, 由于 Cooney^[11] & Emerson 在描述 *T. aurantiacus* 时依据的菌株实为 *Dactylomyces crustaceus*, 后来者根据 Cooney & Emerson 对该种的概念对他们的菌株所进行的鉴定无疑是错误的, 因此目前文献资料中仍为不少被鉴定为 *T. aurantiacus* 的真菌可能并不是该菌而是 *T. crustaceus*。*T. aurantiacus* 与 *T. crustaceus* 的区别在于其子囊孢子壁光滑, 具一明显的芽孔, 而后者子囊孢子壁具有细微的小刺, 并产生拟青霉属 (*Paecilomyces*) 无性型。我们的菌形态上与 *T. aurantiacus* 较符合, 因此鉴定为该菌。

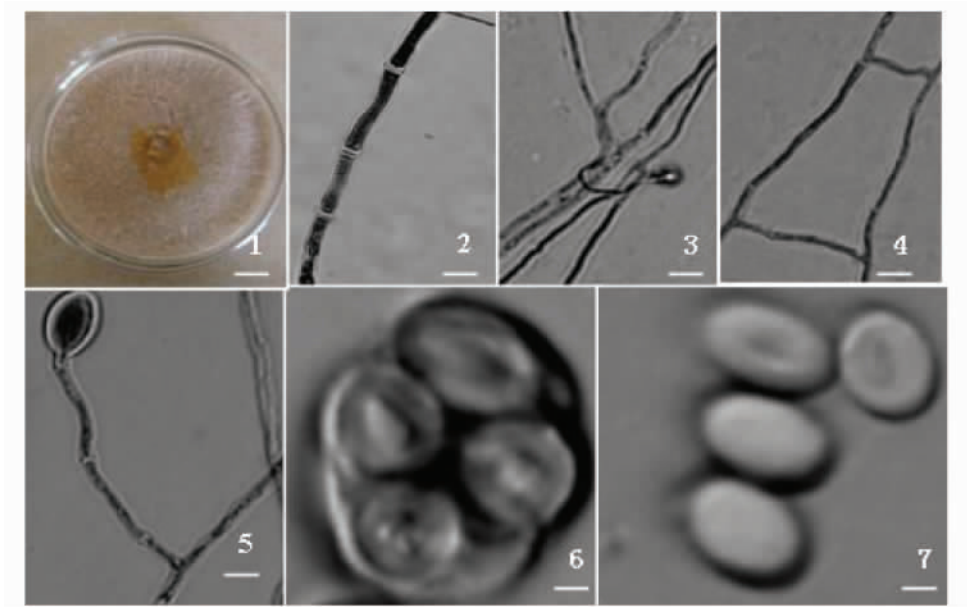


图3 嗜热子囊菌 1. 菌落; 2~4. 菌丝; 5. 分生孢子梗; 6. 子囊; 7. 子囊孢子; 标尺 10 μm

Fig. 3 *Thermoascus aurantiacus* 2~4. hyphae, 5. Conidiophores, 6. Asci with ascospores, 7. Ascospores, Bars: 10 μm

2.1.4 Gxu04 嗜热革节孢 (*Scytalidium thermophilum* (Cooney & Emerson) Austwick, Straatsma & Samson, Mycological Research, 97: 321-328, 1993) 在 PDA 培养基上 50 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 菌落匍匐生长, 生长速度较迅速, 初白色絮状, 后中央灰黑边缘黑色, 呈轮状生长; 菌丝细长, 无色, 光滑, 具分隔与分枝, 直径为 2~3.5 μm ; 菌丝直接膨大为分生孢子, 分生孢子呈单个、成对或者短链状排列, 多顶生或间生, 一般长椭圆形、葫芦形, 较少为圆形、短棒形, 10~20 $\mu\text{m} \times$ 8~12 μm , 初无色, 后为灰黑色。

研究菌株 Gxu04, 通过形态学鉴定属于嗜热革节孢 (*Scytalidium thermophilum* (Cooney & Emerson) Austwick, Straatsma & Samson, Mycological Research, 97: 321-328, 1993^[9]), 该菌株 2008 年 9 月分别分离自高温堆肥和土壤, 广西南宁市。

讨论: 该菌原由 Cooney & Emerson 描述并命名为 *Torula thermophila*, 中文名为嗜热色串孢, 1976 年 Austwick 将其处理为现名。Straatsma & Samson 也认为 *Torula thermophila* 模式的正确名称为 *Scytalidium thermophilum*, 但该种在宏观及微观特征上的变化都比较大, 是一个明显的复合种。

2.1.5 Gxu05 不规则头梗霉 (*Cephalophora irregularis* Thaxter^[6], Bot. Gaz. 35: 158, 1903) 在 PDA 培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 d, 菌落直径可达 9 cm。菌落初为白色, 后淡褐色, 背面观深褐色。菌丝透明, 光滑, 分枝, 分隔, 直径为 2.5~7.0 μm 。分生孢子

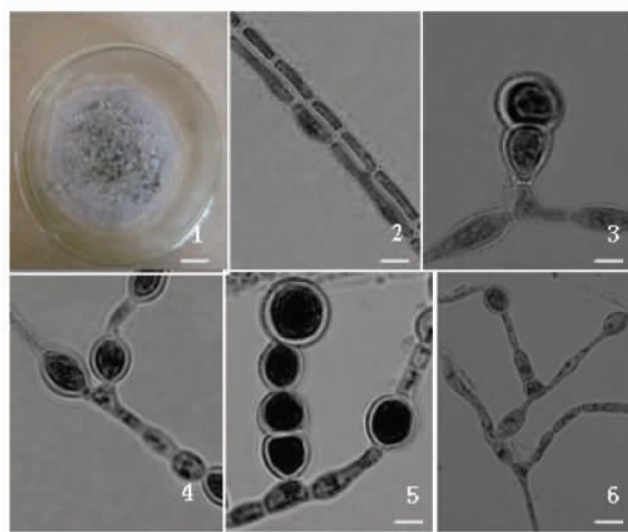


图4 嗜热革节孢 1. 菌落 2. 菌丝 3~6. 间生及顶生孢子(单生、双生和链生) 标尺 10 μm

Fig. 4 *Scytalidium thermophilum* 1. Colonial 2. hyphae 3~6. Intercalary and terminal spores. bars: 10 μm

梗直立, 分隔, 不分枝, 长 20~135 μm , 基部宽 5~8 μm , 顶端细胞膨大, 近球形或棒状, 最宽处直径为 13~35 μm , 最顶端细

胞(产孢细胞)表面着生多个分生孢子。分生孢子梨形、卵形、棒形或其他不规则形状,顶部钝圆,基部渐细,光滑,起初无色,后淡褐色,通常有 1-2 个分隔,分隔处靠近基部,大小为 $20.0 \sim 35.0 \mu\text{m} \times 11.5 \sim 17.5 \mu\text{m}$ 。个别分生孢子也可直接着生于菌丝上。

研究菌株 Gxu05, 通过形态学鉴定属于不规则头梗霉(*Cephalophora irregularis* Thaxter, Bot. Gaz. 35: 158, 1903), 为中国新记录种。该菌株的生长基物为广西南宁市室外堆放的木薯渣堆肥。干制培养物和菌种保存在广西大学应用微生物研究所。

讨论 不规则头梗霉可生长在动物粪便、朽木和土壤等不同的基物上,与该属其他成员的主要区别在于其分生孢子的特殊形状及其仅有的 1-2 个隔膜。Tubaki 发现 *C. irregularis* 可通过菌丝缠绕捕食线虫;Tzean 等在报道 *C. navicularis*^[20]时,证实该菌可通过粘性附枝捕食蛭形轮虫;Baron^[10-12]等也发现 *C. musicola* 和 *C. longispora* 可捕食轮虫和小型节肢动物。这些研究表明该属可能是一类具有捕食线虫、轮虫等小型动物功能的真菌。我们通过在 *C. irregularis* 菌丝培养物中添加腐生线虫 *Paragrellus redivivus* 进行杀线作用测试,并未发现该菌株具有捕食线虫的作用。Tubaki 在其论文中没有指明线虫的种类,因此我们的菌株对腐生线虫没有作用,是由于线虫种类不同,还是菌株之间有差异,无从进行比较,*C. irregularis* 的捕食功能有待进一步证实。

2.2 分子生物学鉴定结果

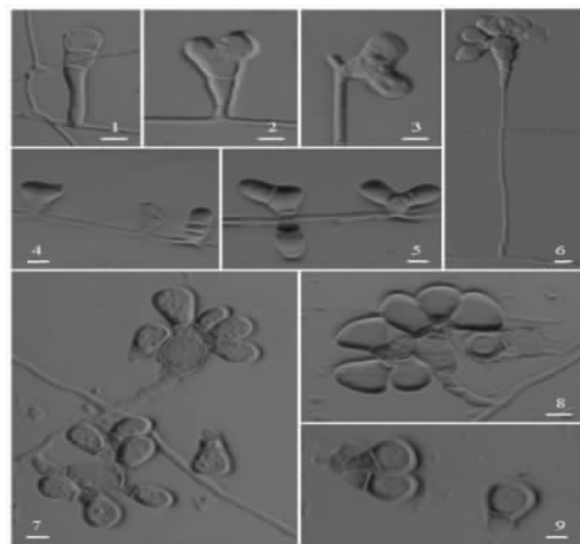


图 5 不规则头梗霉 1~2. 分生孢子梗;3~5. 不同分生孢子直接产于菌丝上;6~8. 分生孢子梗及其成熟的分生孢子;9. 分生孢子 标尺 10 μm

Fig. 5 *Cephalophora irregularis* 1~2. Conidiophores; 3~5. Different conidia arising directly from hyphae; 6~8. Conidiophores with mature conidia; 9. conidia; Bars: 10 μm

在形态学鉴定基础上,对 4 个嗜热真菌物种的代表性菌株进行 ITS1-5.8S-ITS4 区段的序列测定,将测得的序列于 NCBI 数据库中的进行比对,选择相关序列,用 MEGA4.1 软件采用最小距离法绘制系统进化树,结果见图 6。

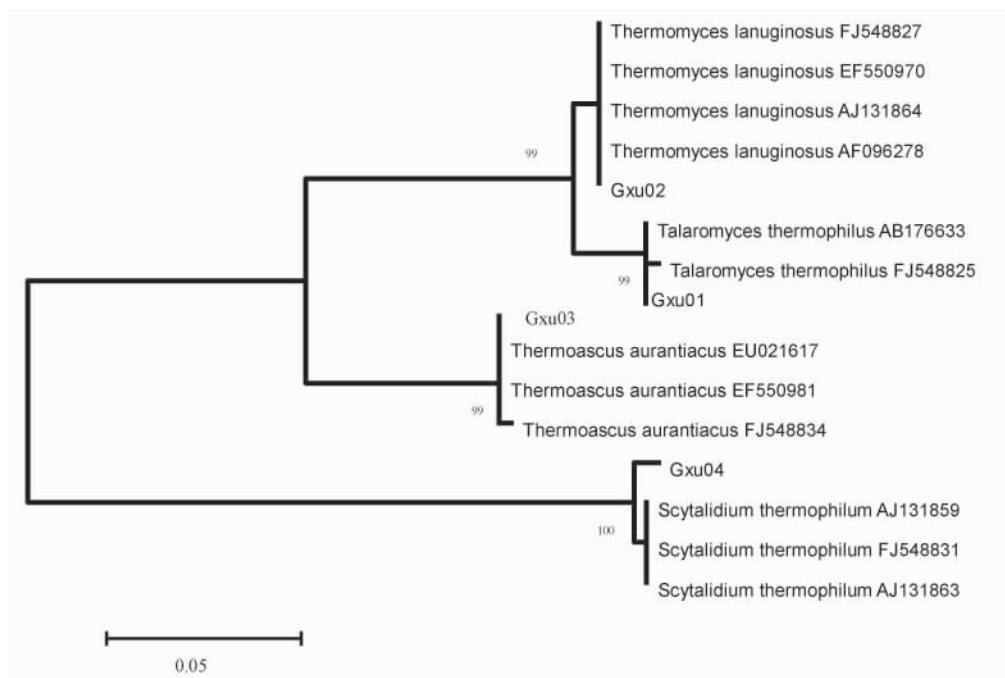


图 6 基于 ITS 序列采用距离法分析构建的 N-J 树

Fig. 6 The N-J tree based on ITS sequence distance analysis

3 讨论

在系统发育树中,菌株 Gxu01 与供试的 2 个嗜热篮状菌(*Ta. thermophilus*) 的菌株聚在一起形成一个分枝,其自展支持率为 99%,表明 Gxu01 与嗜热篮状菌亲缘关系很近,由于我们

未观察到其有性型,故鉴定为该菌的无性型杜邦青霉。Gxu02 的则与疏松状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*) 4 个菌株序列聚集在一起,自展支持率为 96%,结合形态学观察,把 Gxu02 鉴定为疏松状嗜热丝孢菌。Gxu03 的与(*Thermoascus aurantiacus*) 3 个菌株序列聚集在一起,自展支持率为 99%,结合

形态学观察,把 Gxu03 鉴定为嗜热子囊菌。Gxu04 与嗜热革节孢 (*Scytalidium thermophilum*) 的 3 个菌株相聚一起,自展支持率为 100%,尽管其序列与其它菌株有一定的差异性,可视为种内差异,因此把 Gxu04 鉴定为嗜热革节孢。从系统树还可看出,4 个嗜热真菌中,杜邦青霉与疏绵状嗜热丝孢菌亲缘关系最近,其次是嗜热子囊菌,最远的是嗜热革节孢。

参考文献(References)

- [1] Liu B, Liu XZ, Zhuang WY. A new species of *Hyalorbilia* and its anamorph from China[M]. *Nova Hedwigia*, 2005, 81: 145-156
- [2] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15
- [3] Stolk, A C. Thermophilic species of *Talaromyces* Benjamin and *Thermoascus* Miele[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1965, 31: 262-276
- [4] Austwick P K C. Environmental aspects of *Mortierella wolfii* infection in cattle[J]. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1976, 19: 25-33
- [5] Straatsma G, Samson, RA. Taxonomy of *Scytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost [J]. *Mycological Research*, 1993, 97: 321-328
- [6] Thaxter, R. New or peculiar North American Hyphomycetes. III [J]. *Botanical Gazette*, 1903, 35: 153-159
- [7] Tubaki, K. *Cephalophora irregularis* newly found in Japan [J]. *the Journal of Japanese Botany*, 1956, 31: 161-164
- [8] Subramanian, C.V. Fungi imperfecti from Madras-IV. Proceedings of the Indian Academy of Sciences[J]. Section B, 1953, 37: 96-105
- [9] Tzean, S.S., Barron, G.L. A new predatory hyphomycete capturing bdelloid rotifers in soil [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1982, 60(7): 1212-1215
- [10] Barron, G.L., Morikawa, C., Saikawa, M. New *Cephalophora* species capturing rotifers and tardigrades [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1990, 68: 685-690
- [11] Cooney, D G., Emerson, R. Thermophilic Fungi. An account of their biology, activities and classification[J]. W H Freeman & Co, San Francisco, 1964, 27-42
- [12] Mouchacca, J. Thermophilic fungi: Biodiversity and Taxonomic Status[J]. *Crypt Mycol*, 1997, 18: 19-69
- [13] Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64: 461-488
- [14] Lindt, W. Mitteilungen über einige neue pathogene schimmelpilze [J]. *Arch Exp Path Pharmacol*, 1886, 21: 269-298
- [15] Tsiklinskaya, P. Sur les mucédinées thermophiles[J]. *Annales Institute Pasteur Paris*, 1899, 13: 500-505
- [16] Miele, H. Die Selbsterhitzung des Heus. Eine biologische Studie[M]. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 1907, 1-127
- [17] Griffon, E., Maublance, A. Deux moisissures thermophiles [J]. *Bull Soc Mycol France*. 1911, 27: 68-71
- [18] Latouche, C J. On a thermophile species of *Chaetomium*. *Trans Brit Mycol Soc*, 1950, 33: 94-104
- [19] Salar, R., Aneja, K R. Thermophilic Fungi: Taxonomy and Biogeography [J]. *Journal of Agricultural Technology*, 2007, 3(1): 77-107
- [20] Chen, G Y, Chen, Z .C. Thermophilic and thermotolerant fungi in Taiwan [J]. *Transactions of the Mycological Society of Republic of China*, 1988, 3(6): 1-72

(上接第 1033 页)

- [8] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha[J]. *Exp Med*, 1994, 179(4): 1109-1118
- [9] Mayordomo JI. Bone marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines [J]. *Stem Cells*, 1997, 15(2): 94-103
- [10] Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3: 667-672
- [11] Talmor M. Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures [J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(3): 811-817
- [12] Charbonnier LM, Van Duivenvoorde LM, Apparailly F, et al. Immature dendritic cells suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b+ regulatory T cells[J]. *Immunol*, 2006, 177: 3806-3813