

篮状菌属岛篮状菌组的两个中国新记录种

王 龙¹ 孙剑秋² 金世宇³

(1. 中国科学院 微生物研究所真菌学国家重点实验,北京 100101;2. 绍兴文理学院 生命科学学院,浙江 绍兴 312000;3. 北京市京西林场,北京 102300)

摘 要 为了调查我国篮状菌(*Talaromyces*)的物种资源,采用改进的土壤样品分离方法从青海和河南的土壤样品分离得到两株篮状菌(AS 3.15811=12260 和 AS 3.15848=14002)。通过形态学和基于CaM和ITS的分子种系学研究确定其为篮状菌属岛篮状菌组(*Talaromyces* sect. *Islandici*)的我国两个新记录种,即安拉阿巴德篮状菌(*T. allahabadensis*)和鸽色篮状菌(*T. columbinus*)。它们均生长缓慢,产生绒状菌落。*T. allahabadensis* AS 3.15811的分生孢子稀疏,灰绿色,帚状枝排列不紧密,菌丝黄白色,瓶梗安瓶形,分生孢子柠檬形,壁光滑。*T. columbinus* AS 3.15848的分生孢子蓝灰色,帚状枝排列紧密,孢梗茎和梗基顶端明显膨大,分生孢子球形或梨形至椭球形,壁光滑。这两个种的发现进一步丰富了我国篮状菌物种资源储备。

关键词 分类学;分子系统学;霉菌;青霉

中图分类号 R714.2

文献标识码 A

0 引言

篮状菌属(*Talaromyces*)岛篮状菌组(section *Islandici*)的物种通常生长缓慢,形成绒状菌落,并产生萜醌类次级代谢产物,使得其菌丝呈现橙黄色。这些萜醌类次级代谢产物通常具有动物毒性,属于真菌毒素(mycotoxins)。如 *T. islandicus* (Sopp) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert 产生的 islandicin, luteoskyrin, erythrokyrin, rugulosin, skyrin 等真菌毒素具有肝脏和肾脏毒性并致癌。大米被 *T. islandicus* 污染会变成浅橙黄色,称为黄变米,长期食用黄变米会导致肝癌^[1]。*T. radicus* (A. D. Hocking & Whitelaw) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert, *T. rugulosus* (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert 和 *T. wortmannii* (Klöcker) C. R. Benj. 主要产生 rugulosin 和 skyrin。rugulosin 具有抗金黄色葡萄球菌活性^[2, 3]。有学者发现 skyrin 是一种非多肽类的小分子降血糖物质^[4],但此后再也没有相关的研究报道。*T. rugulosus* 和 *T. wortmannii* 还可以产生多种酶类,如 *T. rugulosus* 可以产生芸香苷酶(beta-rutinosidase)和磷酸酶(phosphatase)^[5, 6]。*T. wortmannii* 可以产生尿烷酶(urethanase)降低尿烷的致癌风险^[7]。另外,*T. wortmannii* 在土壤中可以分泌挥发性有机物(volatile organic compounds, VOCs),促进植物种芽生长并增强抗病性^[8]。岛篮状菌组的种类是非常重要的生物资源,截止到2019年12月,全球该组共报道了33个种,而我国只发现了8个种^[9-12]。本文报道该组的2个我国新记录种,即安拉阿巴德篮状菌(*T. allahabadensis* (B. S. Mehrotra & D. Kumar) Samson, N. Yilmaz & Frisvad)和鸽色篮状菌(*T. columbinus* S. W. Peterson & Jurjevič)。

1 材料与方 法

1.1 样品采集和分离

土壤样品采自我国青海省西宁市湟中县塔尔寺和河南省洛阳龙门石窟荒野。样品约25g置于无菌的

收稿日期:2019-12-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31750001,31870013);中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDY-SSW-SMC029)资助

通讯作者:王龙,汉族,男,博士,副研究员,研究方向:青霉与曲霉系统分类学,E-mail: wl_dgk@sina.com.

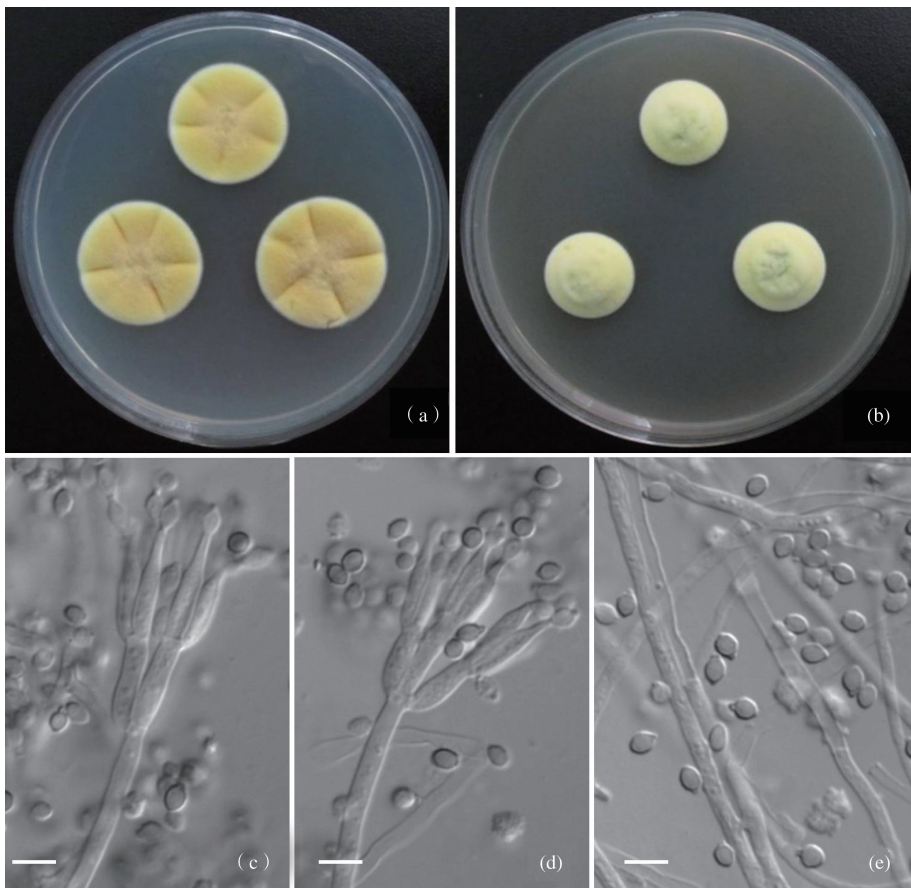
塑料袋中封好,记录采集地、基物种类、采集日期、经纬度和采集人信息.样品分离采用 Malloch^[13]的倍比稀释倾皿法并做了改进,即将样品碾碎,取约 1 g 样品放入装有 9 mL 的无菌 0.1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)水溶液大试管(20×200 mm)中,盖紧无菌硅橡胶试管塞,震荡混匀成悬浊液,作为第一稀释度 10^{-1} .然后迅速取该稀释度的悬浊液 1 mL 倒入第二个同样的大试管中摇匀,作为第二稀释度,依此类推直到第四个稀释度 10^{-4} .取最后 2 个连续的稀释度的悬浊液约 1 mL 倾倒在事先倒好的马丁培养基(DRBC, Dichloran rose bengal chloramphenicol)的平皿(规格 90 mm),用无菌涂布棒均匀涂布,于 25 °C 倒置培养.从第 3 天开始观察并挑取单菌落转接于麦芽精琼脂(MEA)的小平皿(规格 60 mm),于 25 °C 倒置培养 7-14 天,然后用封口膜封好,于 4 °C 保存以待鉴定.分离得到的 2 株篮状菌 12260 和 14002 保存于中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC),保藏号分别为 AS 3.15811 和 AS 3.15848.

1.2 形态学方法

菌落颜色的描述参照 Ridgway^[14]的色谱.培养基及培养条件为查氏酵母精琼脂(CYA)25 °C、37 °C, MEA 25 °C,均培养 7 d 后观察和描述.显微结构观察:取在 MEA 上生长旺盛时的产分生孢子的结构做载片观察和描述.鉴定参考资料为 Raper and Thom、Pitt、Yilmaz, et al 的专著和论文^[15-17].

1.3 PCR 扩增和测序

DNA 的提取参考 Wang and Zhuang^[18].扩增钙调蛋白基因(calmodulin gene, *CaM*)的引物为 AD1: 5'-gccgactctttgactgaagagc-3'和 Q1: 5'-gcatcatgagctggcagaactc-3'^[19];扩增 rDNA ITS1-5.



注:(a) 在 CYA 上 25 °C 7 天;(b) 在 MEA 上 25 °C 7 天;(c, d) 分生孢子梗;(e) 分生孢子.标尺:5 μm.

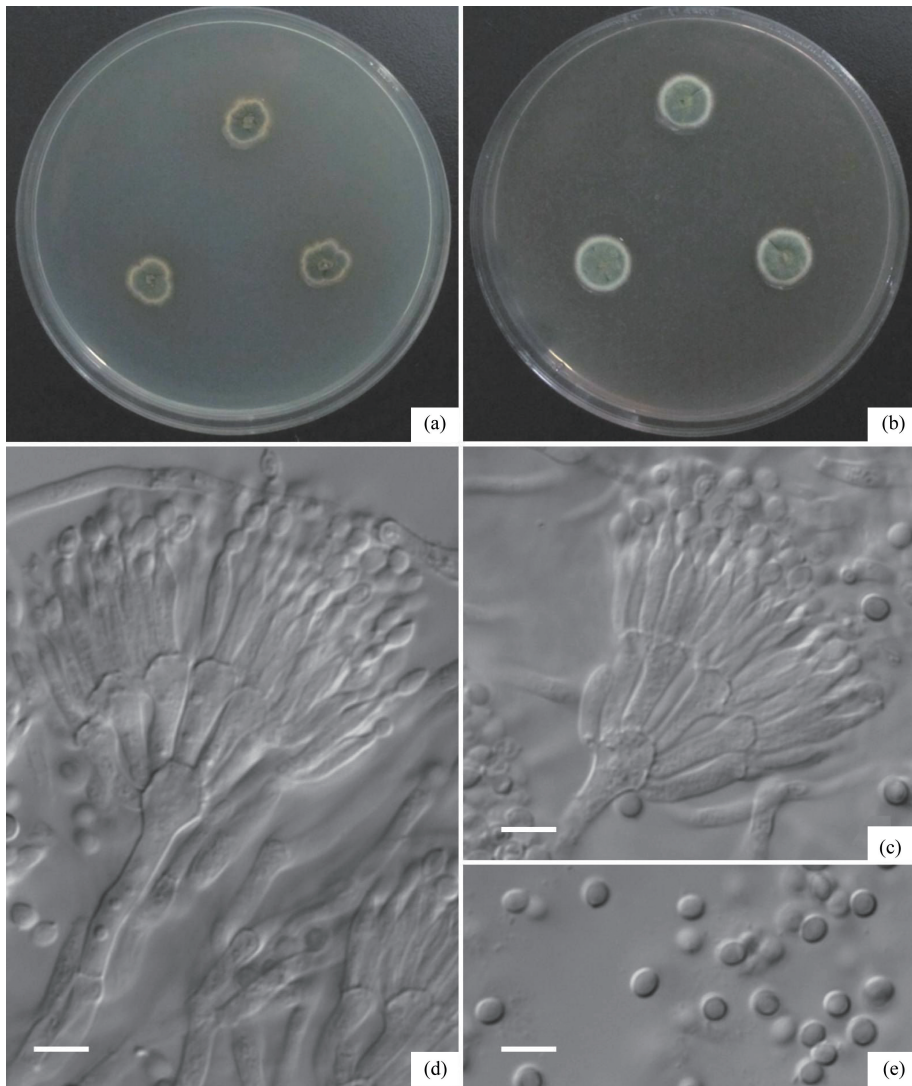
图 1 安拉阿巴德篮状菌(*T. allahabadensis* AS3.15811)的形态学形状

8S-ITS2 序列(ITS)引物选择 ITS5: 5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3'和 ITS4: 5'-tcctcgccttattgatatgc-3'^[20].PCR 扩增反应在无菌的 0.2 mL 薄壁平盖 Eppendorf 管中进行,20 μL 反应体系含有基因组 DNA 1.0 μL,正向和反向引物(10 μM)各 0.5 μL,双蒸水 8 μL,2×PCR 扩增缓冲液(0.05 u/μL Taq polymerase,4 mM MgCl₂,0.4 mM dNTPs 10 μL).PCR 扩增反应程序:94 °C 加热 3 min;然后共进行 34 个温度循环:94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s;最后在 72 °C 延伸 5 min.PCR 产物各取 5 μL 与 5 μL 的 100

bp DNA ladder 用 2.0% 的琼脂糖凝胶 (agarose gel) 在 80 V 电压下电泳 15 min, 再用 0.5 g/mL 的溴乙锭 (EB, ethidium bromide) 染色 10 min 后在波长 365 和 254 nm 的紫外线下观察. 显示单一、明亮扩增区段长度条带的 PCR 扩增产物 (*CaM* 约 700 bp, *ITS* 约 600 bp) 由生物技术有限公司用 ABI3730 (Applied Biosystems, Drive Foster City, CA, USA) 进行双向直通测序.

1.4 分子种系学分析

原始序列用生物学软件 Bioedit 7.0.9^[21] 进行人工校对、编辑, 得到准确无误的全区段序列, 提交到 GenBank (AS3. 15811: *CaM* = MN857548, *ITS* = MN847718; AS3. 15848: *CaM* = MN857549, *ITS* = MN847719). 岛篮状菌组物种的模式菌株和本研究的两个菌株的 *CaM* 和 *ITS* 序列分别用 MEGA 6^[22] 进行对位排列后 (alignment) 剔除序列不完整的菌株, 做成序列矩阵 (*CaM* 共有 34 株, *ITS* 共有 31 株). 然后用最大可能法 (Maximum Likelihood, ML) 分析, 并采用自展法 (bootstrap) 进行 1000 次重复评估各分支的可靠性, 其中空格 (gaps) 选择 partial deletion^[23].



注: (a) 在 CYA 上 25°C 7 天; (b) 在 MEA 上 25°C 7 天; (c, d) 分生孢子梗; (e) 分生孢子, 标尺: 10 μm .

图 2 鸽色篮状菌 (*T. columbines* AS3. 15848) 的形态学形状

2 结果

通过形态学和基于 *CaM* 与 *ITS* 的分子种系学分析, 确定在青海省西宁市湟中县塔尔寺和河南省洛阳龙门石窟土壤分离到的这两株篮状菌分别为安拉阿巴德篮状菌 (*T. allahabadensis*, AS 3. 15811=12260) 和鸽色篮状菌 (*T. columbinus*, AS3. 15848=14002), 均为我国新记录种 (图 1-图 4).

2.1 安拉阿巴德篮状菌

Talaromyces allahabadensis (B. S. MEhrobtra & D. Kumar) Samson, N. Yilmaz & Frisvad, Stud. Mycol. 70: 174, 2011(图 1)

在查氏酵母精琼脂(CYA)上 25 °C, 7 d, 菌落直径 24-25 mm, 较厚, 中央稍凹陷, 少量辐射状沟纹; 边缘完整; 质地绒状; 分生孢子结构稀疏; 菌丝呈钼黄色(Baryta Yellow) (R. Pl. IV); 渗出液无; 可溶性色素无; 反面橙红色.

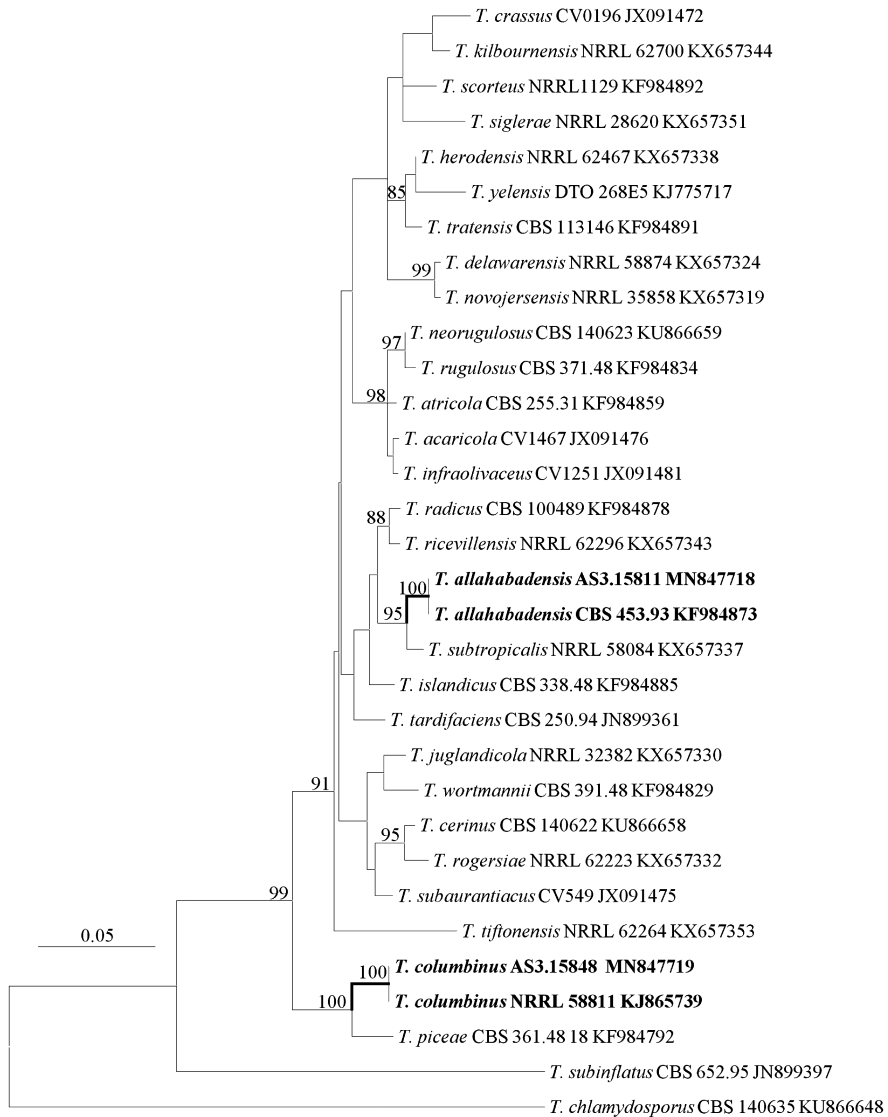
在麦芽精琼脂(MEA)上 25 °C, 7 d, 菌落直径 16-18 mm, 较厚, 凸面, 平坦, 边缘完整; 质地绒状; 分生孢子结构稀疏, 灰绿色; 菌丝浅绿黄色, 近于浅鲜绿色 Light Viridine Green(R. Pl. VI); 渗出液无; 可溶性色素无; 反面棕红色.

在查氏酵母精琼脂(CYA)上 37 °C, 7 d, 菌落直径 20-22 mm, 菌落特征类似 CYA 上 25 °C.

分生孢子梗产生于表面菌丝, 孢梗茎(60-)90-150(-200) μm × 2-2.5 μm, 顶端不膨大, 壁光滑; 帚状枝双轮生; 梗基 2-6 个每轮, 排列不紧密, 10-11 μm × 2-2.5 μm; 瓶梗安甌形, 排列不紧密, 每轮 2-6 个, 10-11 μm × 2-2.5 μm, 梗颈较粗较长; 分生孢子柠檬形, 3-3.5 μm × 2-2.5 μm, 壁光滑.

主要特征: 生长缓慢, 产生绒状菌落, 分生孢子稀疏, 灰绿色, 帚状枝双轮生, 排列不紧密, 菌丝橙黄色, 瓶梗安甌形, 分生孢子柠檬形, 壁光滑.

分布和基物: 青海省西宁市湟中县塔尔寺土壤(AS 3. 15811=12260).



注: 菌株 AS3. 15811 与 *T. allahabadensis* 的模式菌株 CBS 453. 93 同在一个分支, 支持率为 100%; 菌株 AS3. 15848 与 *T. columbinus* 的模式菌株 NRRL 58811 同在一个分支, 支持率为 100%.

图 3 基于CaM 的 ML 系统发育树

2.2 鸽色篮状菌

Talaromyces columbinus S. W. Peterson & Jurjević, PLoS ONE 8(10): e78084, 2013(图2)

在查氏酵母精琼脂(CYA)上 25 °C, 7 d, 菌落直径 8-10 mm, 较厚, 突起, 表面具少量辐射状沟纹, 边缘于培养基内, 波曲状; 质地绒状; 分生孢子结构大量, 深蓝灰色; 菌丝体淡橙黄色, 边缘白色; 渗出液无; 可溶性色素无; 反面棕黄色。

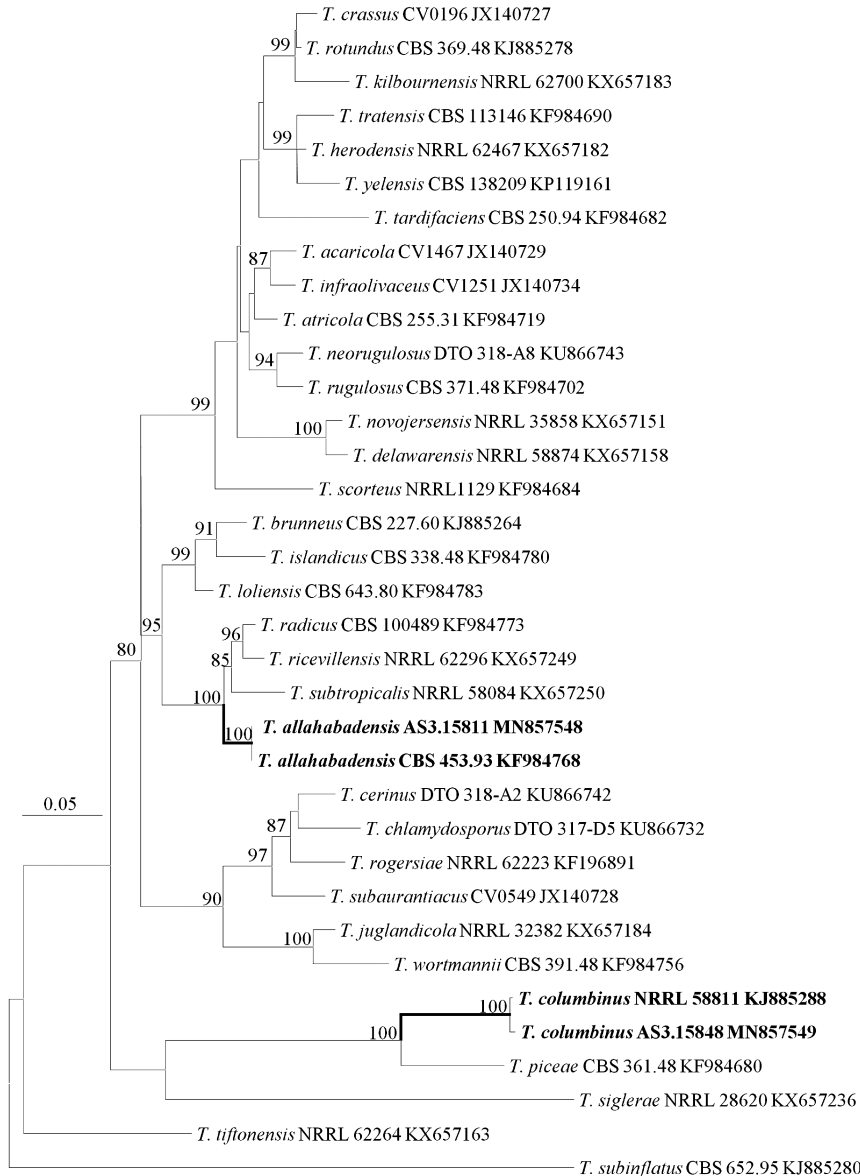
在麦芽精琼脂(MEA)上 25 °C, 7 d, 菌落直径 10-12 mm, 较薄, 中央突起, 辐射状沟纹少量, 边缘于培养基表面, 完整; 质地绒状; 分生孢子结构大量, 暗蓝绿色或灰绿色; 菌丝体黄白色; 渗出液无; 可溶性色素无; 反面褐黄色。

在查氏酵母精琼脂(CYA)上 37 °C, 7 d, 菌落直径 25 mm, 菌落特征类似 CYA 上 25 °C。

分生孢子梗产生于气生菌丝, 孢梗茎 10-60 $\mu\text{m} \times 3-5 \mu\text{m}$, 顶端膨大约 6 μm , 壁光滑; 帚状枝双轮生; 梗基 8-12 个每轮, 排列紧密, 7-10 $\mu\text{m} \times 3-4 \mu\text{m}$, 顶端膨大约 5 μm ; 瓶梗披针形或圆柱形, 排列紧密, 每轮 4-6 个, 7-9 $\mu\text{m} \times 2.5-3 \mu\text{m}$, 梗颈较长; 分生孢子变化较大, 球形至椭球形, 3-5 $\mu\text{m} \times 3-4 \mu\text{m}$, 壁光滑。

主要特征: 生长较慢, 产生致密绒状菌落, 分生孢子蓝灰色, 帚状枝典型双轮生, 排列紧密, 孢梗茎和梗基顶端膨大, 球形至椭球形或梨形, 壁光滑。

分布和基物: 河南省洛阳龙门石窟荒野土壤(AS 3.15848 = 14002)。



注: 菌株 AS3.15811 与 *T. allahabadensis* 的模式菌株 CBS 453.93 同在一个分支, 支持率为 100%; 菌株 AS3.15848 与 *T. columbinus* 的模式菌株 NRRL 58811 同在一个分支, 支持率为 100%。

图4 基于ITS的ML系统发育树

3 讨论

从菌落形态学看,发现于我国的 *T. allahabadensis* 菌株 AS 3. 15811 与模式菌株 CBS 453. 93 生长速率非常相近,虽然它们的产孢能力差别较大,AS 3. 15811 在 CYA 和 MEA 上产生稀疏分生孢子,而 CBS 453. 93 则产生大量深灰绿色分生孢子,但其显微结构完全相同. 另外,它们的 *CaM* 序列一个碱基也不差,*ITS* 序列只相差 1 个碱基,而且基于 *CaM* 和 *ITS* 分子系统学分析显示这两株菌以 100% 的支持率聚在一起. 我国的 *T. columbinus* 菌株 AS 3. 15848 比模式菌株 NRRL 5881 生长稍慢,在 CYA 和 MEA 上产分生孢子比 NRRL 5881 更多^[24-26]. 但其 *CaM* 和 *ITS* 序列以及显微形态完全相同,而且 *CaM* 和 *ITS* 分子系统发育树也显示这两株菌以 100% 的支持率聚在一起(图 3, 4). 因此,可以确认我国的这 2 株菌鉴定无误.

本研究报道的 *Talaromyces* sect. *Islandici* 这两个我国新纪录种在我国尚属罕见,在作者长达 20 多年的青霉与曲霉的物种调查及分类工作中属于首次发现,而且只发现于青海(*T. allahabadensis*)和河南(*T. columbinus*)两省. 但根据国际报道,这两个种分布范围应该较广泛,如 *T. allahabadensis* 发现于印度、泰国、墨西哥及欧洲等地,*T. columbinus* 则发现于美国和肯尼亚^[27]. 可能是该两种生长缓慢,在分离培养过程尚未长出就被快速生长的种类覆盖. 在本研究中我们对 Malloch 的分离方法做了改进,采用 0.1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)代替水作溶剂制作土壤悬浊液,土壤微粒可以悬浮于溶剂不易沉淀,因而分散效果较好,这样涂平板后样品散布均匀. 而且从培养第 3 天开始观察并挑取单菌落,此时生长缓慢的物种已长出微小菌落而尚未被生长快速的物种覆盖便被挑出. 采用本改进的分离方法可以成功分离到土壤稀有物种或生长缓慢的物种.

参 考 文 献

- [1] Oh JY, Kim EN, Ryoo MI, et al. Morphological and molecular identification of *Penicillium islandicum* isolate KU101 from stored rice[J]. *Plant Path J*, 2008, 24: 469-473.
- [2] Breen J, Dacre JC, Raistrick H, et al. Studies in biochemistry of microorganisms 95. Rugulosin, a crystalline colouring matter of *Penicillium rugulosum* Thom[J]. *Biochem J*, 1955, 60: 618-626.
- [3] Yamazaki H, Koyama N, Omura S, et al. New rugulosins, Anti-MRSA antibiotics, produced by *Penicillium radicum* FKI-3765-2[J]. *Org Lett*, 2010, 12: 1572-1575.
- [4] Parker JC, McPherson RK, Andrews, et al. Effects of skyrin, a receptor-selective glucagon antagonist, in rat and human hepatocytes[J]. *Diabetes*, 2000, 49: 2079-86.
- [5] Reyes I, Bernier L, Simard RR, et al. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1999, 28: 291-295.
- [6] Narikawa T, Shinoyama H, Fujii T. A beta-rutinosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 2000, 64: 1317-1319.
- [7] Zhou ND, Gu XL, Tian YP. Isolation and characterization of urethanase from *Penicillium variable* and its application to reduce ethyl carbamate contamination in Chinese rice wine[J]. *Appl Biochem Biotech*, 2013, 170: 718-728.
- [8] Yamagiwa Y, Inagaki Y, Ichinose Y, et al. *Talaromyces wortmannii* FS2 emits β -caryphyllene, which promotes plant growth and induces resistance[J]. *J Gen Plant Pathol*, 2011, 77: 336-341.
- [9] Yilmaz N, Visagie CM, Frisvad JC, et al. Taxonomic re-evaluation of species in *Talaromyces* section *Islandici*, using a polyphasic approach[J]. *Persoonia*, 2016, 36: 37-56.
- [10] Chen AJ, Sun BD, Houbraken J, et al. New *Talaromyces* species from indoor environments in China[J]. *Stud Mycol*, 2016, 84: 119-144.
- [11] Peterson SW, Jurjevi Z. New species of *Talaromyces* isolated from maize, indoor air, and other substrates[J]. *Mycologia*, 2017, 109: 537-556.
- [12] 孔华忠, 王龙. 中国真菌志第 35 卷·青霉属及其相关有性型属[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [13] Malloch D. *Moulds their isolation, cultivation and identification*[M]. Toronto, Canada: University of Toronto Press, 1981.
- [14] Ridgway R. *Color standards and color nomenclature*[M]. Washington DC, USA: Published by the author, 1912.
- [15] Raper KB, Thom C. *A Manual of the Penicillia*[M]. Baltimore, USA: Williams and Wilkins, 1949.
- [16] Pitt JI. *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*[M]. London, UK: Academic Press, 1979.
- [17] Yilmaz N, Visagie CM, Houbraken J, et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*[J]. *Stud Mycol*, 2014, 78: 175-341.

- [18] Wang L, Zhuang W-Y. Designing primer sets for amplification of partial calmodulin genes from penicillia[J]. *Mycosystema*, 2004, 23: 466-473.
- [19] Wang L. Four new records of *Aspergillus* section *Usti* from Shandong Province, China[J]. *Mycotaxon*, 2012, 120: 373-384.
- [20] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[J]. Innis MS, Gel-fand DH PCR protocols: a guide to methods and applications, New York, USA: Academic Press, 1990, 26: 315-322.
- [21] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95-98.
- [22] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0[J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30: 2725-2729.
- [23] Hall BG. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA[J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30: 1229-1235.
- [24] Mehrotra BS, Kumar DA. A new species of *Penicillium* from India[J]. *Can J Bot*, 1962, 40: 1399-1400.
- [25] Samson RA, Yilmaz N, Houbraken J, et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*[J]. *Stud Mycol*, 2011, 70: 159-183.
- [26] Peterson SW, Jurjevic Z. *Talaromyces columbinus* sp nov, and genealogical concordance analysis in *Talaromyces* clade 2a[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8: e78084.
- [27] Yilmaz N, Visagie CM, Frisvad JC, et al. Taxonomic re-evaluation of species in *Talaromyces* section *Islandici*, using a polyphasic approach [J]. *Persoonia*, 2016, 36: 37-56.

Two New Records of *Talaromyces* Section *Islandici* Species from China

WANG Long¹ SUN Jian-qiu² JIN Shi-yu³

(1. State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Life Science School, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China; 3. Beijing Jingxi Forest Farm, Beijing 102300, China)

Abstract In order to survey the *Talaromyces* species resource in China, two *Talaromyces* strains were discovered from soil samples from Qinghai and Henan using an improved isolation method. Based on morphological and molecular characters of *CaM* and *ITS*, the two isolates, namely AS3.15811 and AS3.15848, were identified as *T. allahabadensis* and *T. columbinus*, which are two new record species of section *Islandici* of *Talaromyces* from China. They both grow slowly and present velutinous colonies, *T. allahabadensis* AS3.15811 is characterized by sparse sporulation, gray-green conidia *en masse*, loosely-positioned metulae, yellow-white mycelium, ampuliform phialides and lemon-shaped conidia with smooth walls. *T. columbinus* AS3.15848 has blue-gray conidia *en masse*, adpressed penicilli, apically-swollen stipes and metulae, globose or pyriform to ellipsoidal conidia with smooth walls. The discovery of the two species enriched our biological species reserve.

Key words molecular phylogenetics; moulds; penicillia; taxonomy