

贮藏苹果中展青霉素产生菌的分离及其 ITS 序列分析鉴定

刘盼红,岳田利,袁亚宏,高振鹏

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】分离贮藏苹果中的展青霉素产生菌,并对其 ITS 序列进行分析鉴定。【方法】从贮藏库中苹果上分离展青霉素产生菌,采用真菌 ITS 区特异性引物对其 ITS 区进行 PCR 扩增测序,将分离菌 ITS 区序列与 GenBank 中的核酸数据库进行比对分析,确定展青霉素产生菌的生物学分类,并对其亲缘关系进行系统发育分析。【结果】共分离得到 10 株展青霉素产生菌,其中 1 号和 8 号菌株属曲霉属,其他 8 株属青霉属。在系统发育关系上,1 号和 8 号菌为一个类群,其他 8 株菌属于一个类群。【结论】贮藏苹果中分离得到的 10 株展青霉素产生菌为青霉属或曲霉属菌株,它们之间存在着不同程度的亲缘关系。

【关键词】 苹果;展青霉素;展青霉素产生菌;ITS

【中图分类号】 TS201.3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)08-0197-06

Isolation of main patulin-producing strains from storage apples and their ITS sequences analysis and identification

LIU Pan-hong, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong, GAO Zhen-peng

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study isolated main patulin-producing strains from storage apples, analyzed and identified their ITS sequences. 【Method】 In this paper patulin-producing strains were isolated from storage apples and the fungal ITS region-specific primers were used to do ITS PCR amplification sequencing, through the blast analysis between ITS sequences and GenBank nucleic acid database, finally their biological classifications were identified and their relationships were analyzed. 【Result】 ①10 patulin-producing strains were isolated from storage apples. ②Strain 1 and 8 are *Aspergillus*, and the remaining eight strains were *Penicillium*. ③The phylogenetic tree showed that strain 1 and 8 belonged to one group, the other eight strains to another group. 【Conclusion】 10 patulin-producing strains from storage apples are *Aspergillus* or *Penicillium* and they have different levels of the phylogenetic relationship.

Key words: apple; patulin; patulin-producing strains; ITS

展青霉素(Patulin)是青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)和丝衣霉属(*Byssoschlamys*)等多种真菌的次生代谢产物^[1-2],其化学名称为 4-羟基-4-氢-呋喃(3,2 碳)并吡喃-2(6)酮{4-hydroxy-4H-

* [收稿日期] 2008-02-29
[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAK02A24,2006BAK02A18,2006BAK04A05);陕西省重大科技专项计划项目(2006KZ09-G1);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(2005)
[作者简介] 刘盼红(1983—),女,山东新泰人,在读硕士,主要从事食品生物技术研究。E-mail: panhong2008@yahoo. com. cn
[通讯作者] 岳田利(1966—),男,陕西宝鸡人,教授,博士生导师,主要从事食品生物工程技术及食品安全控制技术研究。E-mail: ytl6503@163. com

furo[3, 2-C] pyran-2 (6*H*)-one^[3], 分子式为 C₇H₆O₄。展青霉素广泛存在于多种食品、饲料原料中,特别在以苹果为加工原料的产品中尤为突出。由于展青霉素是一种对动物有致畸、致癌和致突变性的毒素,经皮下注射展青霉素对小鼠具有致癌性,人摄入展青霉素后可引起呕吐和胃刺激症状,所以食品中展青霉素的残留问题已引起世界卫生组织(World health organization,WHO)的高度关注,对其最低限量做了严格规定(<50 μg/L),并有不断降低的趋势^[4-6]。因此,如何有效控制和降低苹果及苹果产品中展青霉素含量,已成为国内外研究的热点。目前,对展青霉素的控制研究主要集中在 2 个方面:①对在苹果生长、贮藏、加工过程中已经产生的展青霉素进行降解与去除;②分离鉴定产生展青霉素的主要真菌,控制其生长繁殖及代谢产生展青霉素。虽然人们已在苹果汁生产加工过程中展青霉素的控制技术方面取得了一些成果,但是并没有从根本上解决展青霉素的毒害问题,还应该从抑制展青霉素产生菌的生长和毒素产生等方面进行更加深入而广泛的研究^[6]。苹果及苹果汁中的展青霉素主要来源于苹果原料中的展青霉素产生菌。国内外研究报道表明,青霉属和曲霉属的许多菌株都能在一定条件下侵染苹果原料并产生毒素^[7-10],但是由于原料产地和气候等因素的影响,使不同苹果上的主要展青霉素产生菌具有一定的差异性。

现代分子生物学技术已广泛应用于真菌分类学研究,与传统的按照真菌的形态、生理生化特征分类方法相比,更能准确地反映真菌的进化和种群间的亲缘关系,其中利用 PCR 扩增真菌核糖体内转录间隔区段(Internal Transcribed Spacer, ITS)进行真菌鉴定的方法得到了迅速发展^[11]。核糖体 ITS 区具有高拷贝数和广泛的序列多态性,包含保守和变异序列,没有加入成熟核糖体,受到的选择压力较小,进化速率较快。不同物种间 ITS 区序列差异较大^[12],ITS 序列分析已成为真菌分类鉴定的有效手段^[13]。为了有效控制陕西苹果原料中主要展青霉素产生菌的生长繁殖及代谢,本研究对陕西不同品种和产地的苹果原料中的展青霉素产生菌进行了分离,采用 ITS 区通用特异性引物对分离菌的 ITS 区进行了 PCR 扩增、测序和序列分析,确定了其生物学分类地位,构建了系统发育树,分析了其系统发育关系,并对展青霉素产生菌的可靠生物信息进行了追溯,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 原 料

在陕西红果果业有限公司苹果贮藏库中(库温 0 ℃,贮藏时间 240 d,平均相对湿度 80%)取不同品种和产地的苹果(表 1),作为菌种分离材料。

表 1 供试苹果原料品种及产地

Table 1 Variety and area of apples	
原料品种 Variety	产地 Area
秦冠 Qinguan	陕西永寿县 Yongshou
白秦冠 WhiteQinguan	陕西扶风县 Fufeng
青苹 Green Apple	陕西扶风县 Fufeng

1.2 主要培养基

1.2.1 分离培养基 葡萄糖 10.0 g,蛋白胨 5.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g,琼脂粉 20.0 g,孟加拉红 10 mL(1/300 水溶),蒸馏水 900 mL, 121 ℃灭菌 20 min。使用时,待培养基融化并冷却至 50 ℃左右,每 100 mL 加入 0.3 mL 10 g/L 的链霉素。

1.2.2 纯化培养基 马铃薯汁 1 000 mL,葡萄糖 20.0 g,琼脂 20.0 g,121 ℃灭菌 20 min。马铃薯去皮,挖芽眼,洗净,切片,称 300 g 放入 1 000 mL 自来水中用文火煮沸 10~20 min,双层纱布过滤,滤液加水补至 1 000 mL。

1.2.3 产毒培养基 苹果汁培养基,苹果清汁取自陕西恒兴果汁厂,其可溶性固形物含量为 120 g/L, pH 值为 4.0,121 ℃灭菌 20 min。

1.3 展青霉素产生菌的分离纯化及展青霉素的检测

1.3.1 菌株的分离 将不同品种苹果的腐烂部位用无菌水制成 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ 和 10⁻⁶ g/mL 稀释液,从菌液浓度最小的稀释液开始,用移液枪吸取 200 μL,涂布法接种于菌种分离培养基内,28 ℃、相对湿度 90%、恒温恒湿下条件倒置培养。

1.3.2 菌株的纯化 当分离菌株在培养基上进入生长旺盛期时,挑取不同形态霉菌菌株的孢子,在菌种纯化培养基上作平板划线纯化,28 ℃、相对湿度 90%、恒温恒湿条件下倒置培养。按此方法连续划线直至单个平板上为形态单一的菌落时,挑取平板上的单菌落进行纯培养。

1.3.3 产毒代谢培养 用无菌水将分离到的各个菌株制成孢子悬液,按照体积分数 1%的接种量,分别接种于盛有 50 mL 产毒培养基的 250 mL 三角瓶

内,使其孢子初始浓度为 10^6 mL^{-1} , 28°C 下静置培养 14 d 后,检测培养液中展青霉素含量。

1.3.4 展青霉素 HPLC 检测 参照出口饮料中棒曲霉素的检验方法^[14]进行。

1.4 展青霉素产生菌总 DNA 的提取

挑取大约 25 mg 菌落孢子,加液氮反复研磨成粉状,将研磨好的样品转到 2.0 mL 离心管中,每管加 1 mL 预冷的抽提缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA),涡旋混匀。每管加 60 μL 200 g/L 的 SDS, 65°C 水浴温育 1 h(每 10 min 颠倒一次)。加等体积的苯酚:氯仿:异戊醇溶液(V(苯酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1),轻颠倒混匀, 4°C 、14 000 r/min 离心 10 min。取上清液于 1.5 mL 的离心管中,加等体积的氯仿,轻轻颠倒混匀, 4°C 、14 000 r/min 离心 10 min。取上清液,加等体积的异丙醇(-20°C 预冷), -20°C 放置 1~2 h, 4°C 、14 000 r/min 离心 10 min。弃异丙醇,用体积分数 70% 乙醇(预冷)和无水乙醇(预冷)500 μL 各洗涤 1 次,每次洗后均要在 4°C 、14 000 r/min 离心 10 min,超净台中室温干燥。加适量 ddH₂O 或 100 μL TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA),置 4°C 溶解, -20°C 保存。取 5 μL 总 DNA 液加 1 μL 10 $\times$ Loading buffer 点样,用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳定性检测提取的 DNA,并用 UVP 凝胶成像分析系统照相记录电泳结果。另取 DNA 提取液,用 ND-1000 核酸蛋白检测仪定量检测其 DNA 浓度,以确定 PCR 扩增体系中模板 DNA 的用量。

1.5 展青霉素产生菌 ITS 区的 PCR 扩增

1.5.1 引物的设计与合成 引物为真菌 ITS 序列的通用引物^[15] ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' 和 ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.5.2 ITS 区的 PCR 扩增 以上述提取的基因组 DNA 为模板,用设计合成的引物进行 ITS 区基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μL : 10 $\times$ PCR Buffer 5.0 μL , 4 $\times$ dNTP 混合物 1.0 μL , 25 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ MgCl₂ 4.0 μL , 10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ 引物 ITS1 和 ITS4 各 1.0 μL , 模板 DNA 100~120 ng, 5 U/ μL MBI Taq DNA 聚合酶 0.4 μL , ddH₂O 补足 50 μL 。PCR 扩增条件为 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 50 s, 50°C 复性 1 min, 72°C 延伸 1.5 min, 34 个循环;

72°C 终延伸 10 min。PCR 扩增完成后,取 10 μL 扩增产物加 1 μL 10 $\times$ Loading buffer, 进行 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测,观察有无特异性目的条带出现。

1.6 展青霉素产生菌 ITS 区序列的测定与分析

1.6.1 测序 将 ITS 区 PCR 产物用 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, UVP 凝胶成像分析系统下切下目的条带,采用 TIANGel Midi Purification Kit 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱型)回收纯化 PCR 产物。将纯化后 PCR 产物直接寄往上海生工生物工程技术有限公司双向测序,测序引物为 PCR 扩增引物。

1.6.2 ITS 区的序列分析 将得到的双向测序结果经 DNASTar 的 SeqMan5.00 拼接后即为菌株的 ITS 序列。然后将展青霉素产生菌的 ITS 序列与 GenBank 中的核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行 Blast 比对分析,找出与其相似性最高的菌株,确定每株菌的生物学分类地位。

1.6.3 系统发育树的构建 将得到的展青霉素产生菌的 ITS 序列用 Clustalx1.83 进行多重序列比对后,用系统发育软件包 Phylip3.66 的 DNAmk, 采用最大似然法构建基于 ITS 序列分析的展青霉素产生菌系统发育树,并对所构建的系统发育树进行自举分析(Bootstrap, 重复 1 000 次),以估算其内分支的 Bootstrap 值(支持率),进而确定其系统发育关系。

2 结果与分析

2.1 展青霉素产生菌的分离

从贮藏库不同品种和产地的腐烂苹果中,分离纯化得到了 10 株展青霉素产生菌,其代谢产物经 HPLC 检测均含有展青霉素,各菌株编号、来源和代谢产物中展青霉素的含量见表 2。由表 2 可以看出,10 株菌产生展青霉素的能力不同,其中 3 号菌株产量最高,达 334.04 mg/L; 1 号菌株的产毒量最低,为 0.13 mg/L,但也超过了世界卫生组织对食品中展青霉素最低限量^[6]的要求。因此,所得到的 10 株菌均为苹果生产加工中严重危害食品安全的展青霉素产生菌。经形态学初步鉴定,1 号、8 号菌株属曲霉属;其他 8 个菌株属青霉属。为进一步确定分离的 10 株菌的分类地位,需对其进行分子生物学分类鉴定。

表 2 展青霉素产生菌的来源及其代谢产物中展青霉素的含量
Table 2 Sources of patulin-producing strains and results of patulin production

菌株 Strain	苹果品种 Source	采样地点 Area	展青霉素/ (mg·L ⁻¹) Patulin	菌株 Strain	苹果品种 Source	采样地点 Area	展青霉素/ (mg·L ⁻¹) Patulin
1	青苹 Green	陕西扶风县 Fufeng	0.13	6	青苹 Green	陕西扶风县 Fufeng	176.32
2	秦冠 Qinguan	陕西永寿县 Yongshou	2.42	7	秦冠 Qinguan	陕西永寿县 Yongshou	0.52
3	青苹 Green	陕西扶风县 Fufeng	334.04	8	青苹 Green	陕西扶风县 Fufeng	0.98
4	白秦冠 Whiteqinguan	陕西扶风县 Fufeng	53.59	9	青苹 Green	陕西扶风县 Fufeng	0.26
5	青苹 Green	陕西扶风县 Fufeng	63.05	10	青苹 Green	陕西扶风县 Fufeng	0.21

2.2 展青霉素产生菌总 DNA 的提取

10 株展青霉素产生菌的基因组 DNA 提取结果

如图 1 所示,在大于 2 000 bp 处均有条带出现,可作为模板 DNA 用于进一步的 PCR 扩增。

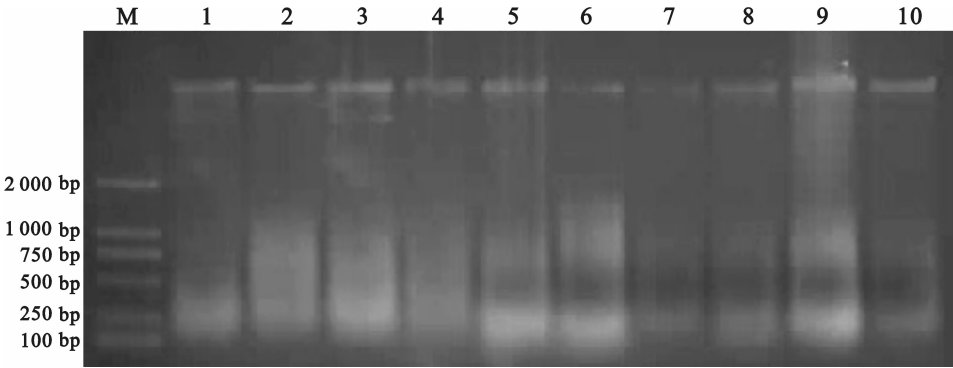


图 1 10 株展青霉素产生菌总 DNA 凝胶电泳结果
M, DL2000 Marker;1~10. 分别为 1~10 号菌株
Fig. 1 General DNA of 10 strains
M, DL2000 Marker;1-10. 1-10 strains

2.3 展青霉素产生菌 ITS 区的 PCR 扩增

由图 2 可见,10 株展青霉素产生菌均能扩增出长 500~750 bp 的均一条带,符合真菌 ITS 区序列长度范围^[16],表明 ITS 区通用引物成功地扩增了 10 株展青霉素产生菌的 ITS 区基因序列。

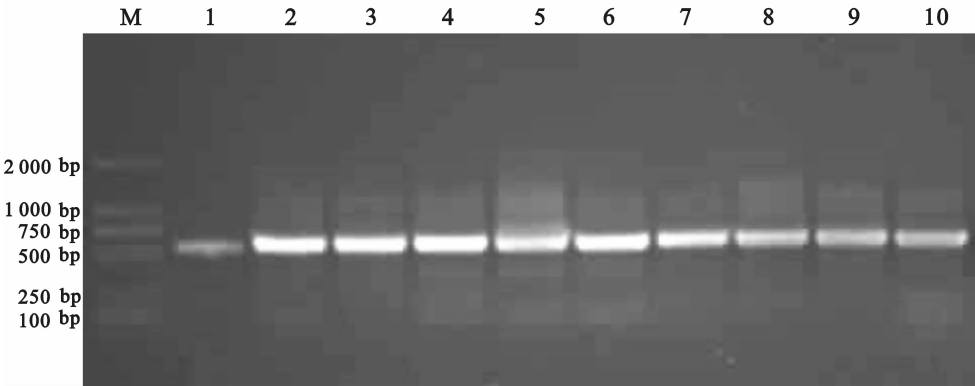


图 2 10 株展青霉素产生菌 ITS 区 PCR 扩增产物的电泳结果
M, DL2000 Marker;1~10. 分别为 1~10 号菌株
Fig. 2 ITS PCR results of 10 strains
M, DL2000 Marker;1-10. 1-10 strains

2.4 展青霉素产生菌 ITS 区的序列分析

10 株展青霉素产生菌 ITS 区序列与 GenBank 核酸数据库 Blast 比对及鉴定结果如表 3 所示。根据表 3 测序比对结果可知,1 号 *Aspergillus sydowii* 和 8 号 *Aspergillus oryzae* 菌株属青霉属;2 号 *Penicillium paneum*、3 号 *Penicillium*

griseofulvum、4 号 *Penicillium chrysogenum*、5 号 *Penicillium expansum*、6 号 *Penicillium expansum*、7 号 *Penicillium chrysogenum*、9 号 *Penicillium expansum* 和 10 号 *Penicillium expansum* 属于青霉素。

表 3 10 株展青霉素产生菌 ITS 区序列比对及鉴定结果

Table 3 Results of blast and identifications on ITS sequences of 10 strains

菌株 Strain	ITS 长度/bp Length	GenBank 登录号 Accession	比对结果 Results	同源性/% Maxidentity
1	580	AY373868.1	<i>Aspergillus sydowii</i> strain NRRL 250	99
2	693	DQ339571.1	<i>Penicillium paneum</i> strain NRRL 25162	100
3	641	DQ339557.1	<i>Penicillium griseofulvum</i> strain NRRL 5256	99
4	583	AY373902.1	<i>Penicillium chrysogenum</i> strain FRR 807	98
5	591	DQ339562.1	<i>Penicillium expansum</i> strain NRRL 6069	96
6	599	DQ339558.1	<i>Penicillium expansum</i> strain NRRL 35231	98
7	595	AY373903.1	<i>Penicillium chrysogenum</i> strain EPA 467	97
8	602	AF459735.1	<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 506	99
9	595	AY425984.1	<i>Penicillium expansum</i> strain VIC	98
10	600	AY425984.1	<i>Penicillium expansum</i> strain VIC	99

2.5 展青霉素产生菌的系统发育分析

由图 3 可以看出,10 株展青霉素产生菌从进化关系上分为 2 大类群,1 号和 8 号菌为一个类群;其余的 8 株菌属于另一类群,其中 9 号、10 号位于同

一分支上,亲缘关系较近,支持率为 70%;5 号、6 号聚在同一支上,支持率为 85%;2 号、3 号、4 号和 7 号在进化树上聚为一支,有不同程度的亲缘关系。

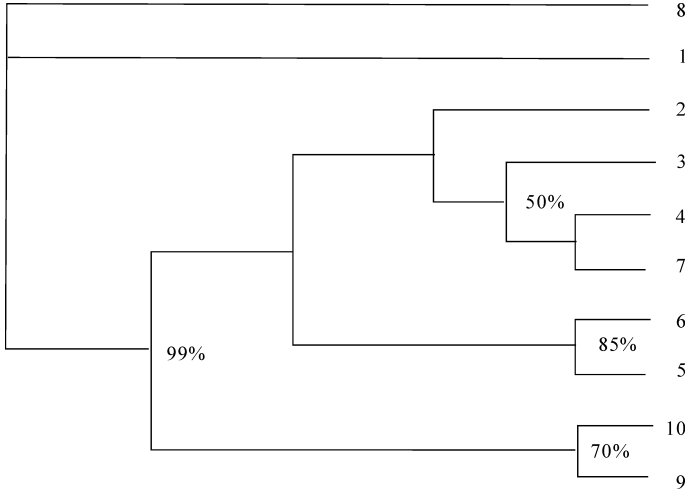


图 3 基于 ITS 区序列分析的 10 株展青霉素产生菌的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetics tree of 10 patulin-producing strains on ITS sequence

3 讨论与结论

展青霉素是国际社会目前关注的苹果汁中主要真菌毒素。本文对贮藏库苹果原料中展青霉素产生菌进行了分离,对其 ITS 区序列进行了测定和分析,并从分子水平对分离的展青霉素产生菌进行了生物分类,构建了系统发育树,初步分析了它们之间的系统发育关系。但若准确定位展青霉素产生

菌之间的系统发育关系,还应做进一步的研究。本研究对陕西苹果中,产生展青霉素的主要真菌的生物信息进行了追溯,为从根源上控制苹果中展青霉素含量提供了理论依据。

本文得到如下主要结论:

- (1)从贮藏库不同品种腐烂苹果中分离纯化得到 10 株不同产毒能力的展青霉素产生菌。
- (2)从 10 株展青霉素产生菌的 ITS 区段扩增出

长 500~750 bp 的条带。1 号和 8 号菌株属曲霉属,其他 8 菌株为属青霉属。

(3)10 株展青霉素产生菌的系统发育关系为:1 号和 8 号菌为一个类群,其他 8 株菌属于另一类群。在另一类群中,9 号和 10 号位于同一分支上;5 号和 6 号聚在同一支上;2 号、3 号、4 号和 7 号聚为一支。

[参考文献]

[1] Dombrink-Kurtzman M A, Blackburn J A. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 98: 241-248.

[2] McKinley E R, Carlton W W. Mycotoxins and Phytoalexins [M]. Boca Raton: CRC press, 1991: 191-236.

[3] Gokmen V, Acar J, Sarioglu K. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 543: 64-69.

[4] 周克权. 展青霉素的化学检测方法 [J]. 国外医学. 卫生学分册, 2001, 28(1): 29-32.

Zhou K Q. The chemical detection of patulin [J]. Foreign Medical Sciences, 2001, 28(1): 29-32. (in Chinese)

[5] 贺玉梅, 董 葵, 杜 娟, 等. 展青霉素产生菌产毒性能研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(3): 302-303.

He Y M, Dong K, Du J, et al. Research on capacity of patulin-producing strains [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2001, 11(3): 302-303. (in Chinese)

[6] 张小平, 李元瑞, 师俊玲, 等. 苹果汁中棒曲霉素制技术研究进展 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1672-1676.

Zhang X P, Li Y R, Shi J L, et al. A review on the control of patulin in apple juice [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(11): 1672-1676. (in Chinese)

[7] Kadakal C, Nas S. Effect of apple decay proportion on the patulin, fumaric acid, HMF and other apple juice properties [J]. Journal of Food Safety, 2002, 22: 17-25.

[8] Taniwaki M H, Bleinroth E W, Martin J D. Patulin-forming moulds in apples and apple juice [J]. Coletanea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1989, 19(1): 42-49.

[9] Hasan H A H. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of ap-

ple fruits and their regulation [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2000, 16: 607-612.

[10] Arici M. Patulin production of *Penicillium* isolates from fermented olives in a synthetic medium [J]. Ernährung, 2000, 24(6): 257-259.

[11] 陈剑山, 郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3785-3786, 3792.

Chen J S, Zheng F C. Application of ITS sequences in fungi classification and identification [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2007, 35(13): 3785-3786, 3792. (in Chinese)

[12] 匡治州, 许 杨. 核糖体 rDNA ITS 序列在真菌学研究中的应用 [J]. 生命的化学, 2004, 24(2): 120-122.

Kuang Z Z, Xu Y. Application of ribosome rDNA ITS sequences in mycology [J]. Chemistry of Life, 2004, 24(2): 120-122. (in Chinese)

[13] 林剑伟, 阙友雄, 陈天生, 等. 核糖体 DNA 的内转录间隔区序列标记在真菌分类鉴定中的应用 [J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2): 292-294.

Lin J W, Que Y X, Chen T SH, et al. Application of ribosome DNA ITS sequences in fungi classification and identification [J]. Letters in Biotechnology, 2007, 18(2): 292-294. (in Chinese)

[14] 张艺兵, 李寅宾, 张 鹏, 等. SN0589-1996 出口饮料中棒曲霉素的检验方法 [S]. 北京: 中华人民共和国国家进出口商品检验局, 1996.

Zhang Y B, Lin Y B, Zhang P, et al. SN0589-1996 Method for the determination of patulin in beverage for export [S]. Beijing: China National Import and Export Commodities Inspection, 1996. (in Chinese)

[15] 刘春来, 文景芝, 杨明秀, 等. rDNA-ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用 [J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(1): 101-106.

Liu C L, Wen J Z, Yang M X, et al. Application of rDNA-ITS in molecular test of phytopathogenic fungi [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007, 38(1): 101-106. (in Chinese)

[16] Iwen P C, Hinrichs S H, Rupp M E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens [J]. Med Mycol, 2002, 40: 87-109.