

進口食材污染真菌之檢測及鑑定

謝松源 研究員

財團法人食品工業發展研究所

電子郵件：syh@firdi.org.tw；傳真：03-5214016

摘要

食品污染真菌造成食品腐敗，其中許多種更可產生真菌毒素直接影響消費者健康，故食品污染真菌之檢測及鑑定向來受到重視。本文介紹常見食品真菌之檢測方法，據以分離普洱茶中嗜乾性真菌 *Eurotium*，所獲分離株並與食品所生資中心所收集之參考菌株進行形態、孢子飾紋和 ITS 及 β -tubulin 基因定序等比較研究，以建立其分類方法及類緣關係。

關鍵詞：食品污染真菌、*Eurotium*、孢子飾紋、類緣關係

Detection and Identification of spoilage fungi in imported food

Sung-Yuan Hsieh, PhD, Research Fellow

Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu 300, Taiwan

E-Mail: syh@firdi.org.tw; Fax: 03-5214016

Abstract

Fungi are a major cause of spoilage in foodstuffs. Many species could produce mycotoxins harmful to the consumer. Rapid detection and accurate identification of food spoilage fungi is essential. A total of 20 *Eurotium* strains which is the most common xerophilic fungi were isolated from the imported Pu'er tea by using DG18 medium. These isolates were compared morphologically and phylogenetically to the type strains of *Eurotium* deposited on BCRC. The surface ornamentations of conidia and ascospores of *Eurotium* species were examined by SEM and showed useful information to aid the identification in this genus. The sequences of ITS and partial β -tubulin gene of *Eurotium* isolation and type strains were determined and analyzed. The results showed partial β -tubulin genes sequences provided better differentiation than ITS sequences in the phylogeny of *Eurotium*.

Key words: *Eurotium* 、 food spoilage 、 phylogeny 、 spore ornamentation

緒 言

作物於栽種生長期各階段經常受到不同蟲害及病害威脅，造成產量減少、產品品質降低及農民損失。作物收成後於儲藏、運送、加工製造等過程若處理不當亦經常遭遇微生物污染的問題，聯合國國際糧農組織 (FAO/UN)估計收穫後的農產品約有 5%因此而損失，其中真菌污染腐敗是一個重要的問題(Kozakiewicz, 1989)。食品腐敗真菌不似植物病原真菌般具有寄主專一性，作物於收成後，有時需經脫殼或加工等許多過程，對真菌之抗性已大大降低，況且本身又具有豐富的營養，當物化環境適合時，多數腐生菌皆可侵入生長。除此之外，有些常見的食品腐敗真菌亦會造成植物病害，例如 *Aspergillus niger* 引起花生冠腐病；有些引起人類或動物的疾病，著名的如 *A. fumigatus*，引起肺部病害；有些於食品腐敗過程中同時產生真菌毒素，如 *Aspergillus flavus* 及 *A. parasiticus* 產生的黃麴毒素，具有極強的毒性及致癌性(Wyllie & Morehouse, 1977)；另外許多真菌的孢子亦會造成過敏問題，這些皆對人體健康造成相當威脅，不容忽視。不過，食品腐敗真菌中如 *Aspergillus*、*Penicillium* 屬中亦有許多種可作為工業或醫藥產業重要生產菌種，生產有機酸、酵素、抗生素或作為發酵菌種(Peberdy, 1987; Powell *et al.*, 1994)，因此食品真菌之檢測及菌種鑑定向來極受重視(Beuchat, 1987)。

食品遭真菌污染腐敗過程，影響其菌相種類及其生長速度之因子，包括食品本身的營養種類及質地(軟、硬度等)外，更重要的是相關之物化等環境因子，包括(1)水活性 (2)pH (3)溫度 (4)空氣(氧氣及二氧化碳含量)及腐生菌本身之競爭能力(Pitt & Hocking, 1985.)。在各種食品腐敗真菌中又以 *Aspergillus* 及 *Penicillium* 兩屬最為常見，因其具有生長迅速、繁殖力強、對環境耐受力佳、可生長的溫度及溼度範圍相當大及易於傳播等競爭優勢。本文僅就常見食品真菌之檢測方法作一介紹，並針對其中一類特殊菌群 *Eurotium* 之研究進行簡要報告。

食品污染真菌之檢測

一般食品真菌之檢測，依樣品種類及分離目的不同而有各種適用的分離方法，經常使用的分離方法有以下三種(Pitt & Hocking, 1985; King *et al.*, 1984.)：

(一)平板稀釋法(dilution plating method)：樣品均質 30 秒至一分鐘，於樣品沉降前儘快進行系列稀釋，稀釋液中可添加少量 Tween 80 有助於樣品分散，接種不同濃度稀釋液 0.2 ml 於培養平板表面，以 L 型玻棒塗抹均勻，接種後平板正向放置於 25°C 下培養，2-3 天後觀察菌落生長情形，其中以 10-100 個真菌菌落之平板較適合計數及進一步純化分離。

(二)直接平板法(direct plating method):通常顆粒狀樣品如穀物、豆類、核果適用此法。必要時於接種前先將樣品以10%漂白水(含0.4% Sodium hypochlorite)進行表面消毒二分鐘,再以無菌水洗淨一次後,直接將樣品放置於適當培養基表面,每個培養平板約放置5-10顆。對於生長較慢或不易分離培養的真菌,如嗜乾性真菌 *Eurotium* 以此法較易分離成功。

(三)表面取樣法(sampling surfaces method):將樣品切取適當大小(表面約一平方公分),將其表面與培養平板表面接觸,稍施壓力後移除樣品;或利用無菌膠帶黏取樣品表面,將膠帶取樣面直接貼附培養基表面,約二天後移除膠帶。此法適用於較大樣品以了解表面菌相組成。

培養基選擇:雖然適合真菌生長的培養基應皆可用於食品真菌之分離。然而,培養基的選擇經常會影響分離之結果。由於食品種類繁多,食品污染真菌亦極具多樣性,並無單一培養基可分離出所有菌種。目前常被用來分離食品污染真菌之培養基有許多種,以一般分離及計數為目的時,Pitt (1985) 建議使用 DRBC Agar (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar; 配方為 Glucose 10g、Peptone 5g、 KH_2PO_4 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、Rose Bengal 25mg、Dichloran 2mg、Chloramphenicol 100mg、Agar 15g、Distilled water 1L),此培養基具有抑制細菌,可減緩生長快速真菌(如 Mucorales)之生長,並對所有真菌菌落生長具有限制性,適合計數或進一步分離純化菌株。

有時依目的來選取適當分離培養基,以分離出目標菌種。如 Pitt *et al.* (1983) 已成功發展 *Aspergillus flavus* 和 *A. parasitica* 之選擇性培養基 AFPA (*Aspergillus flavus* and parasiticus agar; 其配方為 Peptone 10g、Yeast extract 20g、Ferric ammonium citrate 0.5g、Dichloran 2mg、Chloramphenicol 100mg、Agar 15g、Distilled water 1L),可偵測穀物遺產黃麴毒素真菌污染情形。

含水量低的食品包括核果類、香料、魚乾等常有嗜乾性真菌存在,這些真菌於一般培養基中不易生長或生長速度緩慢,容易被其他生長快速的真菌蓋過而不易發現或分離出,故分離時通常需於培養基中添加高濃度蔗糖或甘油使其水活性降低。較通用的培養基為 DG18 (Dichloran 18% Glycerol Agar; 配方為 Glucose 10g、Peptone 5g、 KH_2PO_4 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、Glycerol 220g、Dichloran 2mg、Chloramphenicol 100mg、Agar 15g、Distilled water 1L),此培養基之低水活性 ($a_w=0.955$)可促進嗜乾性真菌生長,並抑制一般真菌生長。目前用以分離普洱茶、中藥食材如枸杞、蓮子等進口貨品,效果良好,相當容易分離出 *Eurotium* 類嗜乾性真菌。

對於一些極端嗜乾性真菌,如 *Xeromyces bisporus*、*Eurotium halophilicum* 等,則需更低水活性培養基,如 MY50G (Malt Extract Yeast Extract 50% Glucose Agar; 配方為 Malt extract 10g、Yeast extract 2.5g、Glucose 500g、Agar 10g、Distilled water 500g),甚至 MY70GF (Malt Extract Yeast Extract 70% Glucose/Fructose Agar; 配方為 Malt extract 6g、Yeast extract 1.5g、Glucose 350g、Fructose 350g、

Agar 6g、Distilled water 300ml) 被推薦使用。

常見食品污染真菌：菌株經分離純化後須進行鑑定，造成食品腐壞的真菌主要分布於接合菌、子囊菌及不完全菌群。各菌群常見種類列出如表一(Pitt and Hocking 1985)。不同菌屬各有其適合鑑定培養基，最佳方式為參照各菌屬專家所著專書或發表之分類文章中所推薦之培養基，並參照其檢索表進行鑑定。如 *Aspergillus* 屬常用的鑑定培養基為 Czapek's Agar (CZA)、Malt-Extract Agar (MEA)、Czapek's Agar with 20% Sucrose (CY20S)，鑑定參照 Raper and Fennell (1965)所著 *The Genus Aspergillus* 一書；*Penicillium* 經常使用的鑑定培養基為 Czapek Yeast Extract Agar (CYA)、MEA 及 25%Glycerol Nitrate Agar (G25N)，鑑定參照 Pitt (1979)所著 *The Genus Penicillium* 一書。

表一：常見食品污染真菌菌屬(Pitt and Hocking 1985)

接合菌	子囊菌	不完全菌	
<i>Absidia</i>	<i>Byssochlamys</i>	<i>Acrermonium</i>	<i>Geotrichum</i>
<i>Mucor</i>	<i>Chaetomium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Lasiodiplodia</i>
<i>Rhizomucor</i>	<i>Emericella</i>	<i>Arthrinium</i>	<i>Moniliella</i>
<i>Rhizopus</i>	<i>Eupenicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Nigrospora</i>
<i>Syncephalastrum</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Paecilomyces</i>
<i>Thamnidium</i>	<i>Monascus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Penicillium</i>
	<i>Neosartorya</i>	<i>Chrysonilia</i>	<i>Pestalotiopsis</i>
	<i>Talaromyces</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Phoma</i>
		<i>Collectotrichum</i>	<i>Scopulariopsis</i>
		<i>Curvularia</i>	<i>Trichoderma</i>
		<i>Epicoccum</i>	<i>Trichothecium</i>
		<i>Fusarium</i>	<i>Verticillium</i>
		<i>Geosmithia</i>	

食品污染真菌 *Eurotium* 菌群之分離及分類研究

由中國引進普洱茶近年來逐漸被國人接受，認為是健康飲品，許多陳年普洱茶，更是價格高昂。普洱茶發源於雲南思茅、西雙版納一帶，傳統製作上是將曬青毛茶(滇青)精製、氣蒸後，放入布袋揉壓成形，置於乾燥的地方自然陰乾。長時間陰乾、儲存及運輸的過程中會造成茶葉變色及成分自然轉換，形成了普洱茶獨特的色澤及風味。普洱茶分為生、熟兩種，生普洱茶分級後直接蒸壓而成，熟普洱茶則是經灑水、渥堆、晾乾、篩選分製而成。在這些製作過程中，無可避免

地形成真菌生長的溫床，而在渥堆及晾乾的過程中，使普洱茶葉中水分漸失，形成水活性極低的環境，使得耐乾旱的真菌得以生長，其中 *Eurotium* 即為當中常見真菌之一。

Eurotium 屬位於子囊菌 Eurotiales 目之下，有性世代產閉囊果，其無性世代屬 *Aspergillus glaucus* group。*Eurotium* 全屬皆為嗜乾性真菌。常見於乾果，香料等低水活性食品中(Blaser, 1975; Hocking & Pitt, 1988; Butinar *et al.*, 2005)，目前已知有 19 個種，分別為 *E. amstelodami*、*E. appendiculatum*、*E. athecium*、*E. carnoyi*、*E. chevalieri*、*E. cristatum*、*E. echinulatum*、*E. glabrum*、*E. halophilicum*、*E. herbariorum*、*E. intermedium*、*E. leucocarpum*、*E. medium*、*E. niveoglaucum*、*E. pseudoglaucum*、*E. repens*、*E. rubrum*、*E. tonophilum* 與 *E. xerophilum* (Peterson, 2000)。

本研究由普洱茶中分離嗜乾性真菌 *Eurotium* 為例來說明進口食材污染菌之分離及分類鑑定之方法。並對 *Eurotium* 分離株與 BCRC/FIRDI(食品工業發展研究所 生物資源保存及研究中心)所收集之標準菌株(Type strains)和參考菌株進行傳統形態觀察並輔以電子顯微鏡及分子生物學方法進行研究。

***Eurotium* 分離培養與形態觀察：**樣品以直接平板法分離，普洱茶磚剝碎，將茶葉分散灑於 DG-18 培養基上，25°C 靜置培養 2 至 3 日，平板置於解剖顯微鏡下檢視，將真菌菌落以解剖針挑起，置於 CY20S 培養基上，25°C 靜置，培養七天後進一步純化。將純化之 *Eurotium* 屬分離株及 BCRC 所收集之 Type strains 和參考菌株，製備孢子懸浮液，接種於 CYA、CAZ、MEA 以及添加 20%-70% 濃度蔗糖於 CYA 培養基上(CY20S、CY40S、CY50S、CY60S、CY70S)，以 25°C 黑暗培養，於第 7 天及第 14 天觀察菌落生長情形並記錄拍照。於解剖顯微鏡下挑取適量成熟分生孢子柄及子囊果製作玻片，於光學顯微鏡下以 400X 及 1000X 倍率觀察。

掃描式電子顯微鏡 (SEM) 樣品製備：以解剖刀切下 5 mm² 含產孢構造之菌落塊，置於 2% 的四氧化鐵(OsO₄) 固定液中，4°C 靜置隔夜；另外於解剖顯微鏡下挑取 *Eurotium* 的閉囊果，於無菌載玻片上將閉囊果以蓋玻片壓破後滴水製成孢子液，將孢子液滴於孔徑 1 μm 之 Nuclepore (Whatman) 過濾膜，將含有孢子之濾膜置於 2% 的四氧化鐵固定液中，於 4°C 下靜置隔夜。接著將固定好之樣品以清水清洗兩次後，以 15%、30%、45%、60%、80%、95% 及 100% 酒精進行序列脫水，再以 33%、66% 及 100% 丙酮進行序列脫水，之後放入以臨界點乾燥機 (Critical Point Dryer, Hitachi HCP-2) 以液態二氧化碳置換丙酮後，進行臨界點乾燥，乾燥完成之樣品以金屬覆膜機 (Eiko Engineering IB-2) 鍍金後於 SEM (Scanning electronic microscope, Hitachi S-450) 下觀察。

***Eurotium* 類緣關係探討：**

1. 染色體 DNA 萃取：

將 *Eurotium* 的孢子液接種於 CY20S Broth (添加 20 %蔗糖的 Czapek Yeast Extract Broth)液體培養基中，25°C, 150 rpm 震盪培養 4~7 天，將菌絲團取出，置於 1.5 ml 微量離心管中，以無菌水將菌絲洗淨，以研磨槍將菌絲研磨均質後，加入 400 µl buffer AP1 及 4 µl RNase (100mg/ml)，震盪後以 65°C 加熱 10 分鐘，加熱過程中，將混合液上下搖晃 2-3 次。加入 130 µl buffer AP2，混勻後置於冰上反應 5 分鐘，13,000 rpm 離心 5 分鐘後，將上清液移至 QIAshredder Mini Spin Column (QIAGEN)，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘，將濾液移至新的微量離心管中，加入濾液體積之 1.5 倍的 buffer AP3/E，混勻後將液體移至 DNeasy Mini Spin Column(QIAGEN)中，以 8,000 rpm 離心 1 分鐘，將濾液丟棄，以 500 µl buffer AW 清洗附著於濾膜上的 DNA 兩次後，13,000 rpm 離心 1 分鐘將濾膜上的液體去除，依照菌體多寡加入 20-100 µl 的無菌水，室溫靜置 5-10 分鐘將 DNA 回溶，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘得到 DNA 溶液。

2. Polymerase chain reaction (PCR)

200 µl 微量離心管中加入以下各項進行 PCR 反應： 1 µl DNA 為模版，加入 5 µl Ex-taq buffer、4 µl dNTP、1 µl primer 1、1 µl primer 2 以及 0.2 µl Ex-taq，最後補水至 50 µl。將上述反應物以以下 PCR 條件反應： 95°C denature 10 分鐘，接著進行 95°C denature 30 秒、55-60°C annealing 30 秒、72°C extension 1~1.5 分鐘，重複反應 30 次，最後 4°C 結束反應。

將 PCR 反應結果以 0.8 % 洋菜膠片作電泳分析，將膠片置入 EtBr 水溶液中染色 15 分鐘，置入乾淨的水中退染一小時後置 UV 下拍照。

所使用的 Primer 序列如下：

- (1) ITS-1 : 5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3'
- ITS-4 : 5'-tctccgcttattgatatgc-3'
- (2) β -tubulinF : 5'-caactgggctaagggtcatt-3'
- β -tubulinR : 5'-gtgaactccatctcgtccata-3'

3. DNA 純化

將 PCR 得到的 DNA 溶液加入五倍體積的 buffer PB，混合均勻後移至 QIAquick column (QIAGEN)，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘後，加入 0.75 ml buffer PE 將 DNA 洗淨，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，以 DNA 濃度加入 20-50µl 無菌水回溶，靜置 5-10 分鐘後，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，得到 DNA 溶液。

4. 定序 PCR 與上機前處理

96 孔盤加入以下各項進行 PCR 反應： 以 150-300 ng DNA 為模版，加入 2 µl 2.5X seq. buffer、1 µl primer、以及 1 µl BigDye v3.1，最後補水至 10 µl。將上述反應物以以下 PCR 條件反應： 96°C denature 10 分鐘，接著進行 96°C denature

10 分鐘, 50°C annealing 5 秒, 60°C extension 4 分鐘, 重複反應 30 次, 最後 4°C 結束反應。

PCR 反應完成後, 將每個孔加入 10 μ l 無菌二次水、60 μ l 絕對酒精與 5 μ l 125mM EDTA, 混勻後室溫靜置 30 分鐘。4,500 rpm, 4°C 離心 30 分鐘, 倒除上清液, 將 96 孔盤倒扣 4°C 離心 1,000 rpm 1 分鐘, 除去多餘液體。再於每個孔加入 150 μ l 70%酒精, 4,500 rpm, 4°C 離心 15 分鐘, 倒除上清液, 將 96 孔盤倒扣 4°C 離心 1,000 rpm 1 分鐘, 除去多餘液體。以真空抽氣 10 分鐘後, 加入 10 μ l Hi-Di foramide, 95°C denature 5 分鐘, 上定序儀分析(ABI-3730)。

結 果

Eurotium 分生孢子為圓形至長橢圓形, 於 SEM 下觀察, 表面突起或具有短刺(圖一)。依表面突起樣式大致可分為四類: 1. 表面具刺狀突起, 包括 *E. caryoni*、*E. repens*、*E. herbariorum*、*E. echinulatum* 與 *E. halophilicum* (圖一 1-5, 7); 2. 表面具丘狀突起, 包括 *E. chevalieri*、*E. intermedium* 與 *E. leucocarpum* (圖一 9, 12, 13); 3. 表面具管狀突起, 包括 *E. appendiculatum*、*E. tonophilum*、*E. amstelodami* 與 *E. cristatum* (圖一 6, 8, 10, 11,); 4. 表面具小隆起, 包括 *E. xerophilum* (圖一 14)。

Eurotium 之有性子囊孢子為圓形至橢圓形, 似雙凸透鏡, 表面平滑、粗糙或具有突起的飾紋, 側面中央具凹槽, 有些種類其凹槽兩側具有環狀突起, 如圖二。形態大致可分為三類: 1. 表面平滑至稍粗糙, 包括 *E. repens* 與 *E. tonophilum* (圖二 5, 15); 2. 表面具小突起, 側面無環狀突起或突起不明顯, 包括 *E. echinulatum*、*E. herbariorum*、*E. rubrum* 與 *E. xerophilum* (圖二 1-3, 6, 14); 3. 表面具明顯突起, 側面具明顯環狀突起, 包括 *E. amstelodami*、*E. appendiculatum*、*E. caryoni*、*E. chevalieri*、*E. cristatum*、*E. halophilicum*、*E. intermedium* 與 *E. leucocarpum* (圖二 7-13, 16), 其中 *E. halophilicum* 之側面環狀突起為五芒狀 (圖二 16)。

Eurotium 菌株以 ITS 片段進行序列分析, 所得到的類緣關係如圖三; 以部分 β -tubulin 基因分析, 所得到的類緣關係如圖四。由普洱茶樣品分離到的 20 株分離株進行部分 β -tubulin 基因定序, 與標準菌株比對所得類緣關係圖如圖五。依據形態觀察及 β -tubulin 基因定序結果, *Eurotium* 分離株分別鑑定為 *E. repens*、*E. chevalieri*、*E. rubrum* 與 *E. halophilicum*。

討 論

Internal transcribed spacer (ITS)位於小核糖體(small ribosome)上，此段序列在演化上具有相當的穩定性，常被用來研究族群間或族群內的演化類緣關係(Peterson, 2000)。然而，將 *Eurotium* 屬的菌株初步做此片段序列分析，發現其種間差異非常小，無法明顯區分各個種間的差別。 β -tubulin 基因為管家基因(housekeeping gene)，已被證實適用於 *Monascus* 屬的分類(Park, 2004)。*Monascus* 屬與 *Eurotium* 屬在分類上同屬於 Eurotiales 目，本實驗分析部分 β -tubulin 基因，所得到的類緣關係顯示部分 β -tubulin 基因可將 *Eurotium* 屬區分成五群，種間的差異性明顯區分較佳。並且顯示 1. *E. pseudoglaucum* 與 *E. repens* 位於同一分支；2. *E. echinulatum* 與 *E. medium* 位於同一分支；3. *E. athecium* 與 *E. rubrum* 位於同一分支，顯示位於同分支者可能為同種。

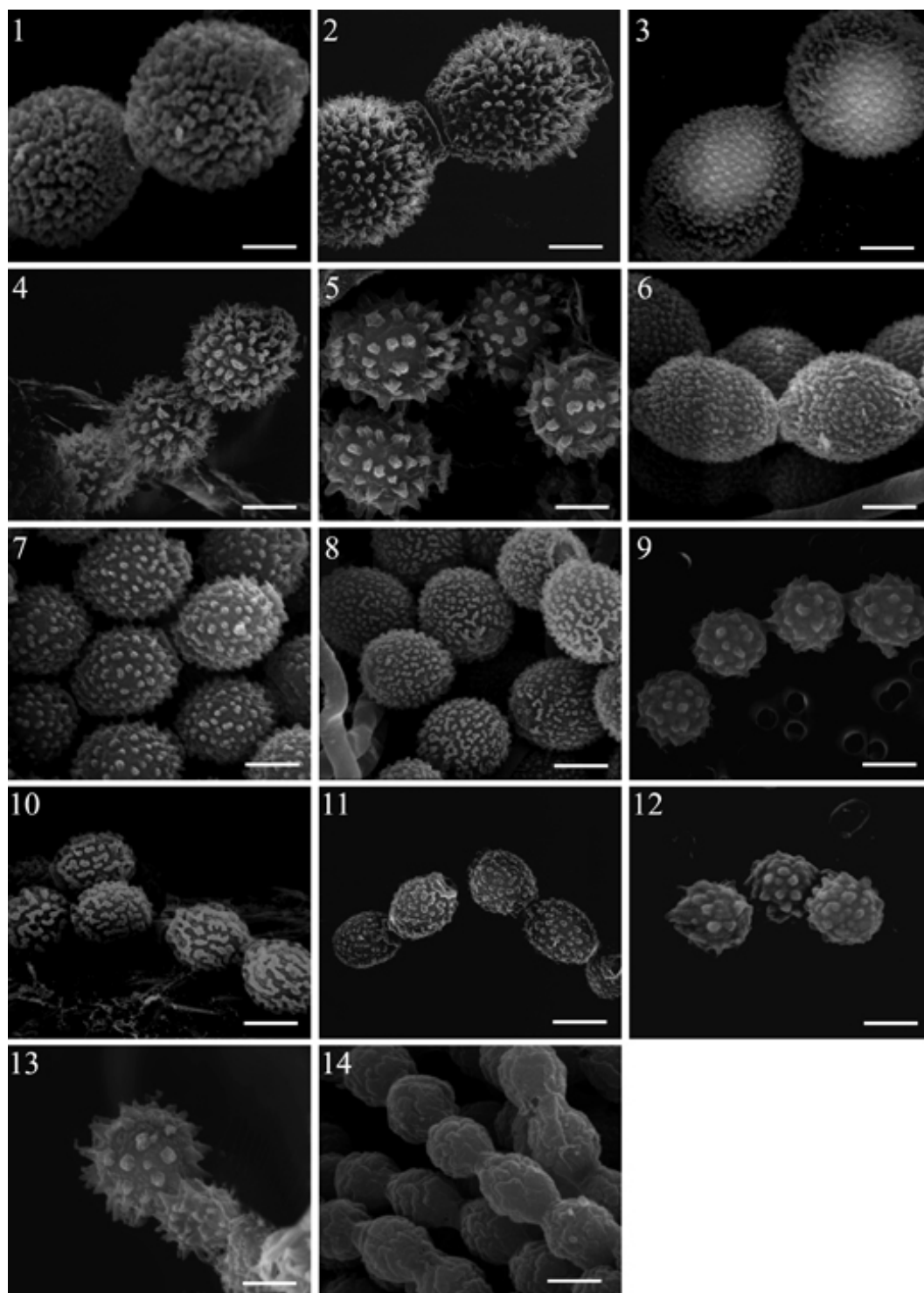
由普洱茶分離之 *Eurotium* 分離株目前鑑定為 *E. repens*、*E. chevalieri*、*E. rubrum* 與 *E. halophilicum*。其中 *E. halophilicum* 為極端嗜乾性，一般鮮少被紀錄(Hocking & Pitt, 1988.)，其適合水活性範圍約為 0.9-0.74 a_w (Hocking, 1993)，進行培養試驗時其蔗糖濃度則必須達 40%及以上時才會開始生長，為台灣新紀錄種。

以掃描式電子顯微鏡觀察 *Eurotium* 之子囊孢子及分生孢子顯示不同種間其孢子表面飾紋具明顯差異，顯示此技術可有效輔助 *Eurotium* 種之鑑定。

引用文獻

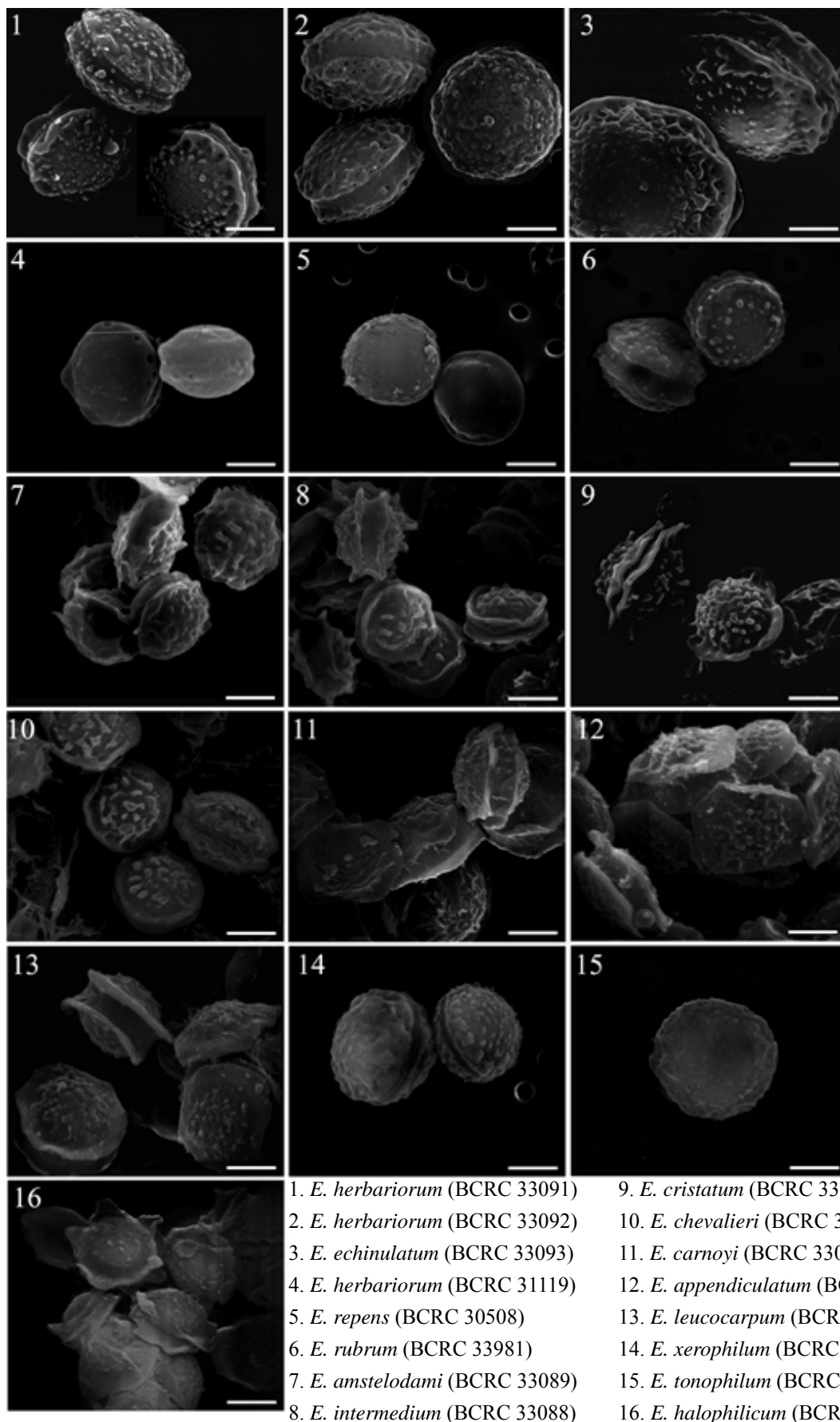
- Beuchat, L. R. 1987. Food and Beverage Mycology. 2nd edition. Van Nostrand Reinhold, New York. 661 pp.
- Blaser, P. 1975. Taxonomische und physiologische Untersuchungen uber die Gattung *Eurotium* Link ex. Fr. Sydowia 28: 1-49.
- Butinar, L., P. Zalar, J. C. Frisvad, and N. Gunde-Cimerman. 2005. The genus *Eurotium* - members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. Fems Microbiology Ecology 51: 155-166.
- Hocking, A. D. 1993. Responses of xerophilic fungi to changes in water activity. In: *Stress Tolerance of Fungi*. (ed. D. H. Jennings), pp. 233-256. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Hocking, A. D. and Pitt, J. I. 1988. Two new species of xerophilic fungi and a further record of *Eurotium halophilicum*. Mycologia 80(1): 82-88.
- King, A. D., Pitt, J. I., Beuchat, L. R. and Corry, J. E. L. 1984. Methods for the Mycological Examination of Food. Plenum Press, New York, 315 pp.
- Kozakiewicz, Z. 1989. *Aspergillus* Species on Stored Products. CAB International Mycological Institute. Mycological Papers. No. 161. 188pp.

- Park, H. G., Stamenova, E. K. and Hohn, S.-C. 2004. Phylogenetic relationships of *Monascus* species inferred from the ITS and the partial β -tubulin gene. *Bot. Bull. Acad. Sin.*45:325-330.
- Peberdy, J. F. 1987. *Penicillium* and *Acremonium*. Plenum Press, New York. 296 pp.
- Peterson, S. W. 2000. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification.* (edited by Samson, R. A. & Pitt, J. I.) Overseas Publishers Association. pp. 323-341.
- Pitt, J. I. 1979. The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, 634pp.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. and Glenn, D. R. 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. appl. Bacteriol.* 54: 109-114.
- Pitt, J. J. and Hocking, A. D. 1985. *Fungi and Food Spoilage.* Academic Press, Sydney, 413 pp.
- Powell, K. A., Renwick, A. Peberdy, J. F. 1994. The genus *Aspergillus*-From Taxonomy and Genetics to Industrial Application. Plenum Press, New York, 380 pp.
- Raper, K. B. & Fennell, D. I.. 1965. *The Genus Aspergillus.* The Williams & Wilkins, Baltimore, 686 pp.
- Wyllie, T. D. and Morehouse, L. G. 1977. *Mycotoxic fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses-An Encyclopedic Handbood.* Vol. I. Mycotoxic Fungi and Chemistry of Mycotoxins. Marcel Dekker, Inc. New York, 523 pp.

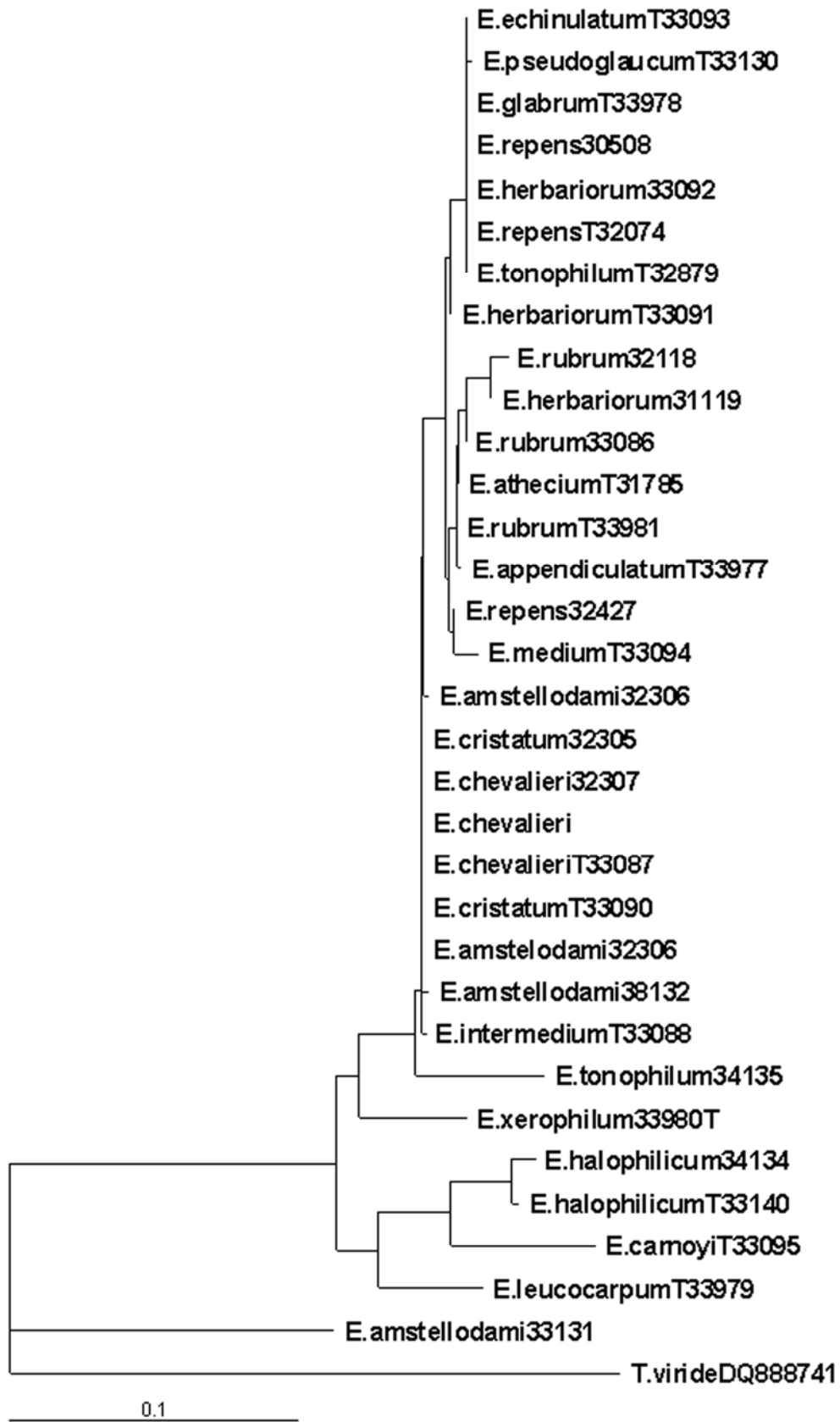


圖一、SEM 下 *Eurotium* 分生孢子形態 bar=10 μ m。

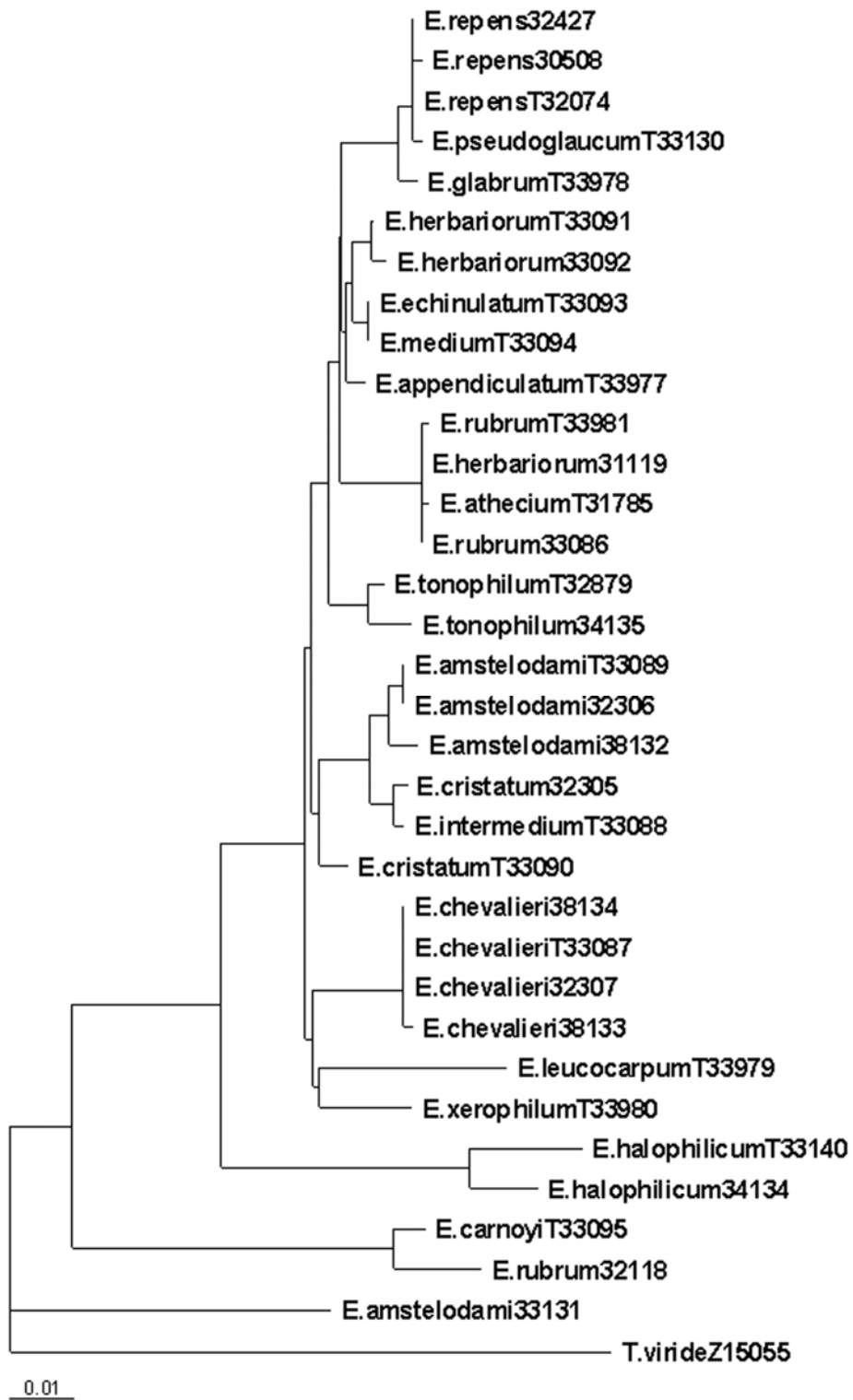
- | | |
|--|--|
| 1. <i>E. carnoyi</i> (BCRC 33095) | 8. <i>E. tonophilum</i> (BCRC 32879) |
| 2. <i>E. echinulatum</i> (BCRC 33093) | 9. <i>E. intermedium</i> (BCRC 33088) |
| 3. <i>E. halophilicum</i> (BCRC 33140) | 10. <i>E. amstelodami</i> (BCRC 33089) |
| 4. <i>E. herbariorum</i> (BCRC 33091) | 11. <i>E. cristatum</i> (BCRC 33090) |
| 5. <i>E. herbariorum</i> (BCRC 33092) | 12. <i>E. chevalieri</i> (BCRC 33087) |
| 6. <i>E. appendiculatum</i> (BCRC 33977) | 13. <i>E. leucocarpum</i> (BCRC 33979) |
| 7. <i>E. repens</i> (BCRC 32074) | 14. <i>E. xerophilum</i> (BCRC 33980) |



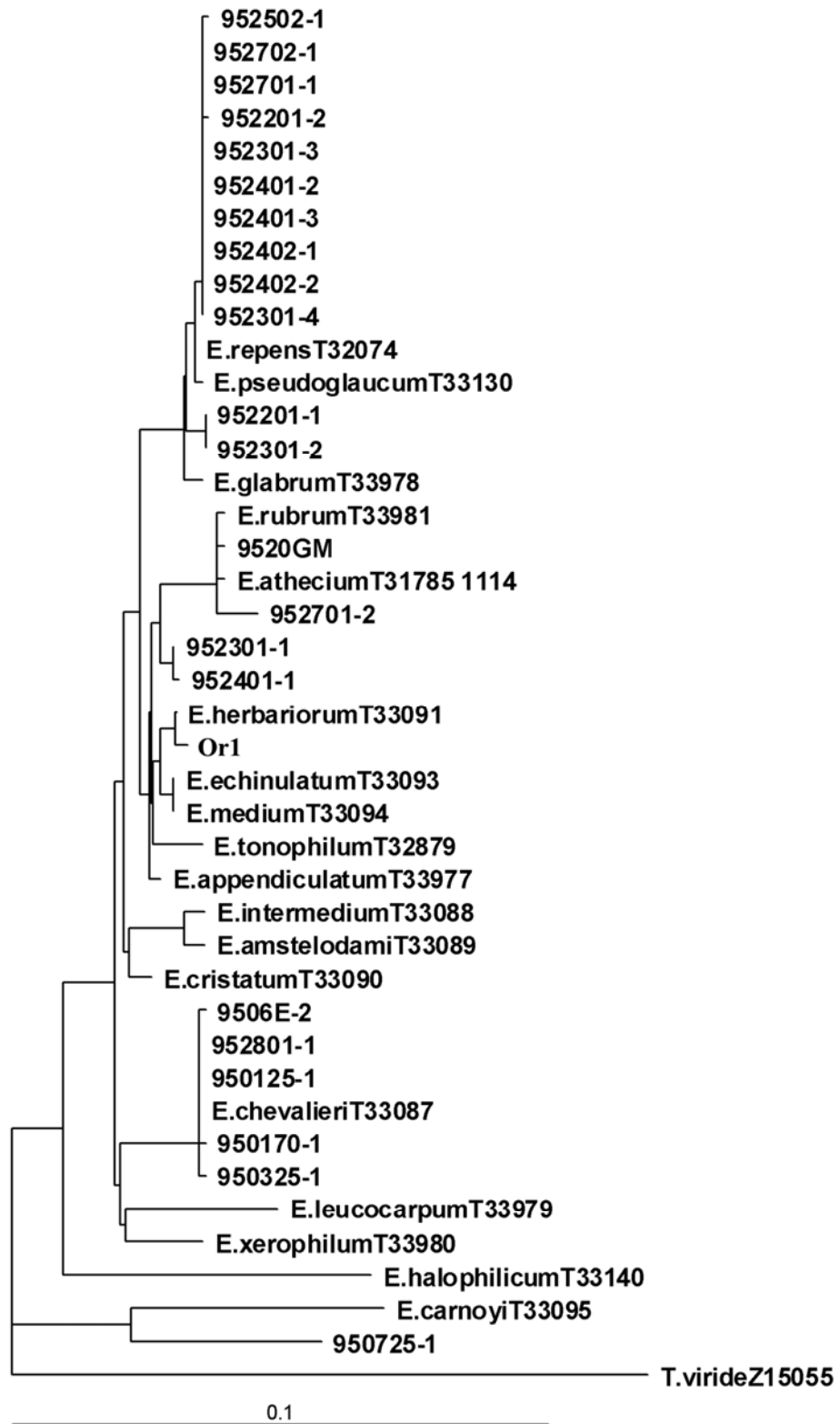
圖二、SEM 下 *Eurotium* 之子囊孢子形態，bar=10 μ m。



圖三、*Eurotium* 屬 ITS 片段類緣關係圖。



圖四、*Eurotium* 屬部分 β -tubulin 基因類緣關係圖。



圖五、*Eurotium* 屬分離株與標準菌株部分 β -tubulin 基因類緣關係圖。