

文章编号: 1005-0906(2014)06-0126-05

我国北方玉米子粒禾谷镰孢菌群 产毒素化学型检测分析

董怀玉¹, 徐 婧¹, 王丽娟¹, 刘可杰¹, 姜 钰¹,
胡 兰¹, 张明会², 徐秀德¹

(1. 辽宁省农业科学院植物保护研究所, 沈阳 110161; 2. 台安县蔬菜综合服务站, 辽宁 台安 114100)

摘 要: 利用镰孢菌产毒素基因特异性引物, 对分离自我国北方春玉米区玉米子粒的禾谷镰孢菌复合种群(*Fusarium graminearum* clade)的43株镰孢菌菌株进行产毒素化学型检测。结果表明, 我国北方玉米子粒中携带的禾谷镰孢菌(包括 *F. graminearum* 和 *F. asiaticum*)检测到2种产毒素化学型, *F. graminearum* 只产生脱氧雪腐镰孢烯醇(Deoxynivalenol, DON), *F. asiaticum* 可以产生脱氧雪腐镰孢烯醇(Deoxynivalenol, DON)和雪腐镰孢烯醇(Nivalenol, NIV)。

关键词: 玉米; 禾谷镰孢菌复合种群; 毒素化学型; PCR

中图分类号: S435.131

文献标识码: A

Molecular Detection of Mycotoxin Chemotypes of Seeds Borne by *Fusarium graminearum* Clade on Maize

DONG Huai-yu¹, XU Jing¹, WANG Li-juan¹, LIU Ke-jie¹, JIANG Yu¹,
HU Lan¹, ZHANG Ming-hui², XU Xiu-de¹

(1. Institute of Plant Protection, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161;

2. Tai'an County Vegetable Integrated Service Station, Tai'an 114100, China)

Abstract: Based on specific primers of *Fusarium* toxin gene, of 43 *Fusarium graminearum* clade strains which isolated from maize seeds of maize producing areas of north China were detected for the mycotoxin chemotypes. The results indicated that *Fusarium graminearum* clade, including the species of *F. graminearum* and *F. asiaticum* were found to produce two kinds of mycotoxin chemotypes. *F. graminearum* was Deoxynivalenol producer only, and *F. asiaticum* were Deoxynivalenol and Nivalenol producers.

Key words: Maize; *Fusarium graminearum* clade; Mycotoxin chemotype; PCR

我国玉米子粒携带的真菌种类多达12属29种, 以镰孢菌为优势种群, 其中禾谷镰孢菌群(*Fusarium graminearum* clade)占有较大比例, 为优势种群^[1]。禾谷镰孢菌可侵染多种植物, 特别是侵染三大粮食作

物小麦、玉米和水稻的穗、茎和根部等部位引起多种病害, 不仅造成严重的产量损失, 且侵染谷物子粒后产生的真菌毒素对人畜健康造成严重威胁, 尤其B型单端孢霉烯(B-trichothecene)危害最大^[2~4], 包括脱氧雪腐镰孢烯醇(Deoxynivalenol, DON)和雪腐镰孢烯醇(Nivalenol, NIV)。关于镰孢菌毒素生物合成基因的研究世界上已经取得重大突破, Lee^[5]和Brown^[6]等研究结果表明, *Tri13* 和 *Tri7* 基因是B-trichothecene生物合成中的关键基因, 也是决定生物合成最终产物DON还是NIV的关键基因, 根据这2个关键基因设计了Tri7F/DON、Tri7F/NIV和Tri13F/DONR、Tri13NIVF/R等专化性引物, 用于检测禾谷镰孢菌生物合成的DON和NIV化学型。

收稿日期: 2014-01-21

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD16B12、2012BAD04B03、2013BAD07B03)

作者简介: 董怀玉(1972-), 研究员, 主要从事玉米、高粱等病虫害防治和种质抗性鉴定研究。Tel: 024-88455636

E-mail: donghy618@163.com

徐秀德为本文通讯作者。Tel: 024-31025636

E-mail: xiudex@163.com

本研究针对我国北方春玉米产区病原禾谷镰孢菌病害日趋严重的生产实际问题,利用禾谷镰孢菌产毒素基因特异性引物,对我国北方春玉米区收集的玉米子粒样本中分离获得的部分禾谷镰孢菌群菌株产毒基因进行分子检测分析,阐明其生物合成的毒素化学类型,为我国北方玉米子粒潜在的毒素污染风险评估、保障我国粮食安全提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 镰孢菌菌株及其来源

供试菌株为禾谷镰孢菌复合种群菌株(包括2个种:*F. graminearum*, 44株和*F. asiaticum*, 14株)共计58株,其中从我国北方春玉米区不同地区收集的玉米子粒样本中分别分离获得的菌株43株(辽宁省27株,吉林省9株,黑龙江省4株,河北省3株);从黑龙江不同地区收集的水稻、小麦子粒上分离获得的禾谷镰孢菌种群复合组菌株5株和4株;来源于德国

的分离自小麦子粒样本的6株*F. graminearum*对照菌株。供试菌株保存于辽宁省农业科学院植物保护研究所。

1.2 菌体培养与DNA提取

采用马铃薯葡萄糖液体培养基(PD)培养法,供试菌株接种于装有100 mL PD液体培养基的三角瓶中,置于振荡培养箱(HZQ-F160)中120 r/min、25℃培养3~5 d,收集菌丝于5 mL离心管中,于冷冻干燥机-110℃冻干2~3 d,取出后研磨成粉末。依照Nicholson的CTAB法^[7]提取DNA,并稀释于1×TE溶液中5℃条件下保存(-40℃条件下冷冻长期保存)。

1.3 DON、NIV引物筛选

选用已报道的与DON、NIV毒素合成密切相关的*Tri7*和*Tri13*基因专化性引物,分别配对*Tri7F/Tri7DON*、*Tri13F/Tri13DONR*、*Tri7F/Tri7NIV*和*Tri13NIVF/Tri13R*进行PCR扩增检测^[8]。引物序列及其配对见表1。

表1 引物配对、PCR反应及其扩增片段
Table 1 Primer pairs, PCR reaction and amplified fragment

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	PCR条件 PCR condition	扩增片段(bp) Amplicon	毒素化学型 Mycotoxin chemotype
Tri7F	TGCGTGGCAATATCTTCTTCTA	60℃, 30 s	381 ~ 445	DON
Tri7DON	GTGCTAATATTGTGCTAATATTGTGC			
Tri13F	CATCATGAGACTTGTKCRAGTTTGGG	58℃, 45 s	282	DON
Tri13DONR	GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG			
Tri7F	TGCGTGGCAATATCTTCTTCTA	60℃, 30 s	465	NIV
Tri7NIV	GGTTCAGTAACGTTCGACAATAG			
Tri13R	TTGAAAGCTCCAATGTCGTG	58℃, 45 s	312	NIV
Tri13NIVF	CCAAATCCGAAAACCGCAG			

1.4 PCR扩增

PCR反应采用25 μL体系:10×buffer 2.0 μL, 10 mmol/L dNTP 0.3 μL, 5 U/μL Taq酶0.2 μL, 模板DNA 1.0 μL,引物0.3 μL(10 μM),ddH₂O补足至25 μL。

PCR反应程序:95℃预变性2 min;94℃ 30 s, 60℃ 30 s(或58℃ 45 s),72℃ 30 s,35个循环;72℃延伸5 min,4℃保存。不同引物及其反应条件见表1。反应结束后取10.0 μL扩增产物于2%琼脂糖凝胶中电泳,电泳结束后在EC3凝胶成像系统下照相。

2 结果与分析

2.1 产DON禾谷镰孢菌检测分析

利用DON毒素特异性引物*Tri7F/Tri7DON*和*Tri13F/Tri13DONR*分别对供试的58个菌株进行

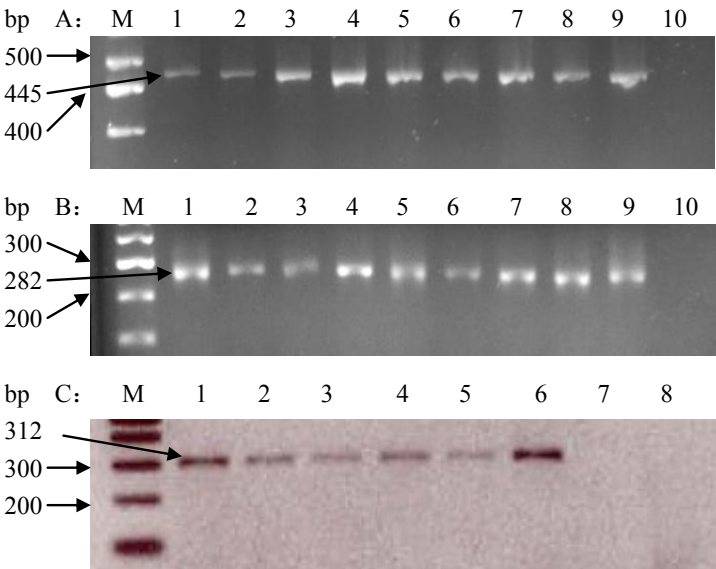
PCR扩增(图1):供试43株菌株分离自我国北方春玉米区玉米子粒携带的菌株,共有32株*F. graminearum*菌株稳定地扩增出381~445 bp和282 bp的特异性目的条带;有8株*F. asiaticum*菌株用*Tri7F/DON*稳定地扩增出381~445 bp的特异性目的条带。来源于德国的6株*F. graminearum*对照菌株均稳定地扩增出381~445 bp和282 bp特异性目的条带。同时有4株分离自我国黑龙江的小麦和水稻子粒上的*F. graminearum*菌株也用*Tri7F/Tri7DON*稳定地扩增出381~445 bp特异性目的条带。结果表明,我国北方春玉米区玉米子粒携带的*F. graminearum*和*F. asiaticum*均能产生DON。

2.2 产NIV禾谷镰孢菌检测分析

利用NIV毒素特异性引物*Tri7F/Tri7NIV*和

Tri13NIVF/Tri13R 分别对 58 株菌株进行 PCR 扩增 (图 1:A、B、C): 只有 6 株 *F. asiaticum* 稳定地扩增出 465 bp 和 312 bp 的特异性目的条带, 其中, 1 株分离自辽宁的玉米子粒, 而其他 5 株均分离自黑龙江的

水稻和小麦子粒样本。供试的 *F. graminearum* 均未获得特异性目的条带。结果表明, 来源于我国北方禾谷类作物子粒的 *F. asiaticum* 产生 NIV, 而 *F. graminearum* 则不产生 NIV。



注: 图 A、图 B 为 DON 化学型检测(A: 引物对 Tri7F/Tri7DON, B: 引物对 Tri13F/Tri13DONR)
M 为 DNA marker(100 bp); 1 为 D1; 2 为 CHG009; 3 为 CHG012; 4 为 CHG024; 5 为 CHG028; 6 为 CHG119; 7 为 CHG002; 8 为 CHG135; 9 为 CHF16; 10 为 CHX29。
图 C 为 NIV 化学型检测(引物对 Tri13NIVF/Tri13R)
M 为 DNA marker(100 bp); 1 为 CHG004; 2 为 CHF22; 3 为 CHF23; 4 为 CHF24; 5 为 CHF25; 6 为 CHF43; 7 为 CHX29; 8 为 CHG130。
Note: A & B: PCR amplification of DON chemotypes(A: primer set Tri7F/Tri7DON, B: primer set Tri13F/Tri13DONR);
C: PCR amplification of NIV chemotypes(primer set Tri13NIVF/Tri13R), M: marker(100 bp). Strains in the table 2.

图 1 产毒素化学型的 PCR 检测

Fig.1 Results of detection of mycotoxin chemotypes by PCR assay

2.3 *F. graminearum* 和 *F. asiaticum* 产毒素化学型检测分析

对供试的 34 株来源于玉米子粒样本中的 *F. graminearum* 菌株进行产毒素化学型检测, 未检测出含有产 NIV 基因的菌株, 有 32 个菌株含有产 DON 基因; 供试的 9 株来源于玉米子粒样本中的 *F. asiaticum* 菌株中, 有 8 个菌株含有产 DON 基因, 只有 1 个菌株含有产 NIV 基因。由此表明, 我国北

方玉米子粒中携带的 *F. graminearum* 含有产 DON 基因而不含有产 NIV 基因, 但有部分菌株即不含有产 DON 基因, 也不含有产 NIV 基因; 而 *F. asiaticum* 同时含有产 DON 基因或产 NIV 基因。源于黑龙江不同地区水稻和小麦子粒样本中的 4 株 *F. graminearum* 菌株只含有产 DON 基因, 而 5 株 *F. asiaticum* 菌株只含有产 NIV 基因。供试菌株来源及菌株产毒素化学类型见表 2。

表 2 菌株来源及产毒素化学型检测结果

Table 2 Origin of strains and results of detection of mycotoxin chemotypes

分离菌株 Isolates	种 类 Species	来 源 Origin	寄 主 Host	毒素化学型 Mycotoxin chemo.	Tri7 基因		Tri13 基因	
					Tri7DON	Tri7NIV	Tri13DON	Tri13NIV
CHF13	<i>F.asiaticum</i>	辽宁抚顺	maize	DON	+	-	-	-
CHF16	<i>F.asiaticum</i>	辽宁抚顺	maize	DON	+	-	-	-
CHX08	<i>F.graminearum</i>	河北	maize	DON	+	-	+	-
CHX26	<i>F.graminearum</i>	河北	maize	DON	+	-	+	-
CHX29	<i>F.graminearum</i>	河北	maize	-	-	-	-	-

续表2 Continued 2

分离菌株 Isolates	种 类 Species	来 源 Origin	寄 主 Host	毒素化学型 Mycotoxin chemo.	Tri7基因		Tri13基因	
					Tri7DON	Tri7NIV	Tri13DON	Tri13NIV
CHG001	<i>F.asiaticum</i>	辽宁阜新	maize	DON	+	-	-	-
CHG002	<i>F.asiaticum</i>	辽宁阜新	maize	DON	+	-	-	-
CHG003	<i>F.graminearum</i>	辽宁阜新	maize	DON	+	-	+	-
CHG004	<i>F.asiaticum</i>	辽宁阜新	maize	NIV	-	+	-	+
CHG009	<i>F.graminearum</i>	辽宁阜新	maize	DON	+	-	+	-
CHG010	<i>F.graminearum</i>	辽宁阜新	maize	DON	+	-	+	-
CHG011	<i>F.graminearum</i>	辽宁阜新	maize	DON	+	-	+	-
CHG012	<i>F.graminearum</i>	辽宁义县	maize	DON	+	-	+	-
CHG013	<i>F.graminearum</i>	辽宁义县	maize	DON	+	-	+	-
CHG014	<i>F.graminearum</i>	辽宁义县	maize	DON	+	-	+	-
CHG015	<i>F.graminearum</i>	辽宁义县	maize	DON	+	-	+	-
CHG016	<i>F.graminearum</i>	辽宁义县	maize	DON	+	-	+	-
CHG017	<i>F.graminearum</i>	辽宁义县	maize	DON	+	-	+	-
CHG019	<i>F.graminearum</i>	辽宁黑山	maize	DON	+	-	+	-
CHG020	<i>F.graminearum</i>	辽宁黑山	maize	DON	+	-	+	-
CHG021	<i>F.graminearum</i>	辽宁黑山	maize	DON	+	-	+	-
CHG022	<i>F.graminearum</i>	辽宁黑山	maize	DON	+	-	+	-
CHG023	<i>F.graminearum</i>	辽宁黑山	maize	DON	+	-	+	-
CHG024	<i>F.graminearum</i>	辽宁黑山	maize	DON	+	-	+	-
CHG025	<i>F.graminearum</i>	辽宁黑山	maize	DON	+	-	+	-
CHG026	<i>F.graminearum</i>	辽宁黑山	maize	DON	+	-	+	-
CHG027	<i>F.graminearum</i>	辽宁阜新	maize	DON	+	-	+	-
CHG028	<i>F.graminearum</i>	辽宁凌海	maize	DON	+	-	+	-
CHG029	<i>F.graminearum</i>	辽宁凌海	maize	DON	+	-	+	-
CHG030	<i>F.graminearum</i>	辽宁凌海	maize	DON	+	-	+	-
CHG113	<i>F.graminearum</i>	吉林省	maize	DON	+	-	+	-
CHG114	<i>F.graminearum</i>	吉林省	maize	DON	+	-	+	-
CHG115	<i>F.graminearum</i>	吉林省	maize	DON	+	-	+	-
CHG117	<i>F.graminearum</i>	吉林省	maize	DON	+	-	+	-
CHG118	<i>F.graminearum</i>	吉林省	maize	DON	+	-	+	-
CHG119	<i>F.graminearum</i>	吉林省	maize	DON	+	-	+	-
CHG120	<i>F.graminearum</i>	吉林省	maize	DON	+	-	+	-
CHG129	<i>F.graminearum</i>	吉林榆树	maize	DON	+	-	+	-
CHG130	<i>F.graminearum</i>	吉林榆树	maize	-	-	-	-	-
CHG133	<i>F.asiaticum</i>	黑龙江绥化	maize	DON	+	-	-	-
CHG134	<i>F.asiaticum</i>	黑龙江绥化	maize	DON	+	-	-	-
CHG135	<i>F.asiaticum</i>	黑龙江绥化	maize	DON	+	-	-	-
CHG136	<i>F.asiaticum</i>	黑龙江绥化	maize	DON	+	-	-	-
D1	<i>F.graminearum</i>	德国	wheat	DON	+	-	+	-
D2	<i>F.graminearum</i>	德国	wheat	DON	+	-	+	-
D3	<i>F.graminearum</i>	德国	wheat	DON	+	-	+	-
D4	<i>F.graminearum</i>	德国	wheat	DON	+	-	+	-
D5	<i>F.graminearum</i>	德国	wheat	DON	+	-	+	-
D6	<i>F.graminearum</i>	德国	wheat	DON	+	-	+	-
CHF22	<i>F.asiaticum</i>	黑龙江佳木斯	rice	NIV	-	-	-	+
CHF23	<i>F.asiaticum</i>	黑龙江佳木斯	rice	NIV	-	-	-	+
CHF24	<i>F.asiaticum</i>	黑龙江佳木斯	rice	NIV	-	-	-	+
CHF25	<i>F.asiaticum</i>	黑龙江佳木斯	rice	NIV	-	-	-	+
CHF38	<i>F.graminearum</i>	黑龙江五常	rice	DON	+	-	-	-
CHF41	<i>F.graminearum</i>	黑龙江绥化	wheat	DON	+	-	-	-
CHF42	<i>F.graminearum</i>	黑龙江绥化	wheat	DON	+	-	-	-
CHF43	<i>F.asiaticum</i>	黑龙江佳木斯	wheat	NIV	-	+	-	+
CHF44	<i>F.graminearum</i>	黑龙江佳木斯	wheat	DON	+	-	-	-

注: +、-表示PCR产物有扩增片段和无扩增片段。

Note: +/- indicated the presence/absence of the PCR product.

3 结论与讨论

镰孢菌毒素的生物合成极其复杂,一般由多基因控制, Kimura^[9]通过对比产 DON 种群和产 NIV 种群的基因序列,结果表明, *Tri7* 和 *Tri13* 基因功能的失活或者改变都将导致产生不同的毒素。本研究采用 *Tri7* 和 *Tri13* 等 2 对特异性引物对我国北方春玉米区玉米子粒携带的禾谷镰孢菌复合种群菌株产毒素化学型进行检测,初步明确我国北方春玉米区玉米子粒携带的禾谷镰孢菌复合种群菌株可以产生 DON 和 NIV 毒素,其中,优势种群 *F. graminearum* 只产生 DON 毒素,而 *F. asiaticum* 以产生 DON 毒素为主,该研究结果与国外研究基本一致^[10~15]。

禾谷镰孢菌群是镰孢菌中主要的产毒菌群,其产毒类型具有一定的地理分布特征, Zhang^[16]和李伟^[17]对分离自我国小麦赤霉病上的禾谷镰孢菌群进行研究,结果表明,我国北方地区禾谷镰孢菌群以 *F. graminearum* 为优势种群,主要产生 DON,而南方地区则以 *F. asiaticum* 为优势种群,主要产生 NIV 为主。本研究中的供试禾谷镰孢菌群菌株均分离自我国北方地区玉米、小麦和水稻的子粒,其优势种群为 *F. graminearum*,其产毒素化学型均为 DON,该结果与国内学者的相关研究相同;但 *F. asiaticum* 的产毒素化学型则出现明显差异,分离自小麦和水稻子粒上的 *F. asiaticum* 产毒素化学型均为 NIV,而分离自玉米子粒上的 *F. asiaticum* 产毒素化学型除来源于辽宁阜新的 1 株产 NIV 外,其余 8 株菌株均产生 DON,可能与菌株的寄生寄主作物不同有关,需进一步研究。

参考文献:

- [1] 曲晓丽,徐秀德,董怀玉,等. 玉米子粒携带真菌种群多样性分析[J]. 玉米科学, 2009, 17(6): 115-117.
- [2] Qu X L, Xu X D, Dong H Y, et al. Study on pathogenic fungi species diversity of maize ear and seed rot[J]. Journal of Maize Sciences, 2009, 17(6): 115-117. (in Chinese)
- [3] Harrison L R, Colvin B M, Greene J T, et al. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1990, 2: 217-221.
- [4] Norred W P, Wang E, Yoo H W, et al. In vitro toxicology of fumonisins and the mechanistic implications[J]. Mycopathologia, 1992, 117: 73-78.
- [5] Wilson M, Ross P F, Owens D L, et al. Experimental production of ELEM. A study to determine the minimum toxic dose for ponies[J]. Mycopathologia, 1992, 117: 115-120.
- [6] Lee T, Han Y K, Kim K H, et al. *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 2148-54.
- [7] Brown D W, McCormick S P, Alexander N J, et al. Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species[J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 36: 224-233.
- [8] Nicholson P, Lees A K, Maurin N, et al. Development of a PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Microdochium nivale* var. *majus* in wheat[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1996, 48: 257-271.
- [9] Chandler E A, Simpson D R, Thomsett M A, et al. Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. cerealis*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2003, 62: 355-367.
- [10] Jennings P, Coates M E, Turner J A, et al. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay[J]. Plant Pathology, 2004, 53: 182-190.
- [11] Abramson D, Clear R M, Gaba D, et al. Trichothecene and moniliformin production by *Fusarium* species from western Canadian wheat[J]. Journal of Food Protection, 2001, 64: 1220-1225.
- [12] Quarta A, Mita G, Haidukowski M, et al. MuLtiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3-, and 15-acetyl deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 259: 7-13.
- [13] Yli-Mattila T, Gagkaeva T, Ward T J, et al. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East [J]. Mycologia, 2009, 101: 841-852.
- [14] Langseth W, Bernhoft A, Rundberget T, et al. Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals[J]. Mycopathologia, 2009, 144: 103-113.
- [15] Yli-Mattila T. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia[J]. Journal of Plant Pathology, 2010, 92: 7-18.
- [16] Guo X W, Fernando W G D, Seow-Brock H Y. Population structure, chemotype diversity, and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba[J]. Plant Disease, 2008, 92: 756-762.
- [17] Zhang J B, Li H P, Dang F J, et al. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China[J]. Mycological Research, 2007, 111(8): 967-975.
- [18] 李伟,胡迎春,陈莹,等. 长江流域禾谷镰孢菌群部分菌株系统发育学,产毒素化学型及致病力研究[J]. 菌物学报, 2010, 29(1): 51-58.
- [19] Li Wei, Hu Ying-chun, Chen Ying, et al. Phylogenetic analysis, chemotype diversity, and pathogenicity of the *Fusarium graminearum* clade in the Yangtze basin[J]. Mycosystema, 2010, 29(1): 51-58. (in Chinese)

(责任编辑:姜媛媛)