

吉林省玉米穗腐病病原真菌中 镰刀菌毒素的研究

胡 南

章 红

(中国农业大学食品系, 北京 100094) (中国农业大学生物学院, 北京 100094)

A Study on Production of Three *Fusarium* Mycotoxins of Corn Ear Rot Pathogenic Fungi in Jilin Province

Hu Nan

(Dept. of Food Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing 10094)

Zhang Hong

(Dept. of Microbiology, College of Biological Sciences, Beijing
Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: Previous studies demonstrated 80% corn ear rot pathogenic fungi are *Fusarium* spp. in Jilin Province. To investigate if these corn ear rot fungi produce moniliformin, (M-toxin), Zearalenone (ZEA) or/and Deoxynivalenol (DON), extracts from corn culture of nine *Fusarium* strains (4 *F. graminearum* strains, 2 *F. moniliforme* strains, 2 *F. moniliforme* var. *subglutinans* strains and 1 *F. equiseti* strain) were analyzed by TLC and further by gas chromatograph-mass spectrometer. The results showed that: (1) DON was in corn cultures of four *F. graminearum* strains and one *F. equiseti* strains; (2) Three of four *F. graminearum* strains detectable produced ZEA; (3) None of the nine *Fusarium* strains produced M-toxin.

Key word: Corn ear rot; *Fusarium* mycotoxin

摘要 先前的研究表明, 在吉林省田间玉米穗腐病病原真菌中镰刀菌类占 80%。本实验采用薄层层析法和气-质联用法对分离自穗腐病的 9 株镰刀菌进行了脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮和串珠镰刀菌素的定性检测。结果在 4 株禾谷镰刀菌和一株木贼镰刀菌玉米培养物中检测到脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 在 3 株禾谷镰刀菌玉米培养物中检测到了玉米赤霉烯酮; 在所有被检菌株中均未测到串珠镰刀菌素。

关键词 玉米穗腐病 镰刀菌毒素

吉林省农科院植保所玉米穗腐病研究组在调查中发现, 吉林省玉米穗腐病的主要病原真菌中, 串珠镰刀菌 (*F. usarium monili-*

forme) 占 53%, 胶孢镰刀菌 (*F.*

subglutinans) 占 15%, 禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*) 占 12%。镰刀菌毒素是镰刀菌产生的毒性次生代谢产物, 它们能引起人畜中毒并可能致癌。由镰刀菌毒素所引起的人畜中毒现象在欧洲、美洲、澳大利亚、日本、南非和中国等地均有报道。章红、罗毅分别在吉林省部分克山病等地方病的重病区玉米样品中检测到串珠镰刀菌素 (*moniliformin*, *M-toxin*) 和脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (*Deoxynivalenol*, *DON*) 等真菌毒素^[1,2]。朱彤霞等也从吉林省的玉米中分离到 4 个产生玉米赤霉烯酮 (*Zearalenone*, *ZEA*) 的镰刀菌^[3]。但有关吉林省玉米穗腐病病原镰刀菌产生真菌毒素的情况未见有系统研究的报道。吉林省是我国玉米生产和出口基地, 弄清该地区穗腐病镰刀菌所产生的毒素很有意义。为此, 与吉林省农科院植保所合作, 对从吉林省田间玉米穗腐病中分离到的 9 株镰刀菌进行了串珠镰刀菌素、玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇三种毒素的检测。

1 材料与方法

供试菌株: 从吉林省田间玉米穗腐病中分离到共计 9 株镰刀菌, 其中 4 株禾谷镰刀菌, 2 株串珠镰刀菌, 2 株胶孢镰刀菌和 1 株木贼镰刀菌 (*F. gquiseti*)。所有菌株的三年田间回接试验表明, 人工接种的平均发病率为 77.77%~94.63%。以上菌株由吉林省农科院植保所玉米穗腐病研究组提供。

玉米培养物: 将上述菌株分别接种于已灭菌的玉米培养基中, 28℃ 培养 6 周后风干、粉碎备用。

硅胶 G 层析板: 2.5 × 7.5cm, 厚 0.2mm, 江苏福山生化试剂厂生产。

AlCl₃ 硅胶 G 层析板: 手工铺制^[4]。

薄层层析显色剂: 1% 2,4-二硝基苯酚的 6N H₂SO₄ 溶液。

岛津 GC-MS 2000 型气相色谱-质谱联用仪。

实验中所需串珠镰刀菌素、玉米赤霉烯

酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准样品均购自 SIGMA 公司。

1.1 串珠镰刀菌素的薄层层析法检测

1g 玉米培养物用 2ml 甲醇提取, 离心, 取上清液 50ml 在硅胶 G 板上点样后层析, 展开剂为氯仿-甲醇 (3:2, v/v), 层析后挥干, 喷显色剂, 置 60℃ 10 分钟使之显色, 串珠镰刀菌素为桃红色斑点, 与标准品相比, 确定待测样品中有无串珠镰刀菌素。

1.2 玉米赤霉烯酮的薄层层析法检测

2g 玉米培养物用适量水湿润后以 5ml 乙酸乙酯提取、离心、取上清液 50μl 在硅胶 G 板上点样后层析, 展开剂为氯仿-乙醇 (9:1, v/v), 层析后挥干在 254nm 紫外灯下观察, 玉米赤霉烯酮为蓝色荧光斑点。与标准品相比, 确定待测样品中有无玉米赤霉烯酮。

1.3 脱氧雪腐镰刀菌烯醇薄层层析法检测

1g 玉米培养物用 2ml 90% 甲醇提取, 离心, 取上清液 50μl 在 AlCl₃ 硅胶 G 板上点样后层析, 展开剂为乙醚-丙酮 (7:3, v/v), 层析后挥干, 置 120℃ 烘烤 10 分钟后在 365nm 紫外灯下观察, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇为蓝色荧光斑点, 与标准品相比, 确定待测样品中有无脱氧雪腐镰刀菌烯醇。

1.4 气相色谱-质谱联用法分析

20g 样品用 100ml 乙腈-水 (3:1, v/v) 提取, 提取液经脱脂浓缩后过 Florisil 色谱柱, 以氯仿-甲醇 (9:1, v/v) 洗脱分离, 洗脱液经浓缩, 衍生化后用气相色谱-质谱联用仪分析确定待测样品中有无玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇。

2 结果

2.1 薄层层析法检测结果

在本实验条件下串珠镰刀菌素标样 R_f = 0.6; 玉米赤霉烯酮 R_f = 0.5; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 R_f = 0.62。对 9 株镰刀菌的玉米培养物薄层层析法分析结果见附表。

附表 薄层层析法和气谱—质谱联用法分析结果

样品编号	菌种名称	薄层层析法 (TLC)			气谱—质谱联用法 (G—M)	
		串珠镰刀菌素 M—toxin	玉米赤霉烯酮 ZEA	脱氧雪腐镰 刀菌烯醇 DON	玉米赤霉烯酮 ZEA	脱氧雪腐镰 刀菌烯醇 DON
10441	禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	—	—	±	—	+
吉 863	禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	—	+	+	++	+
90—5—2	禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	—	+	+	++	+
11151	禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	—	±	+	+	++
10543	串珠镰刀菌 <i>F. moniliforme</i>	—	—	—	—	—
444—2	串珠镰刀菌 <i>F. moniliforme</i>	—	—	—	—	—
159	胶孢镰刀菌 <i>F. subglutinans</i>	—	—	—	—	—
89—2—6	胶孢镰刀菌 <i>F. subglutinans</i>	—	—	—	—	—
10191	木贼镰刀菌 <i>F. equiseti</i>	—	—	±	—	+

“+”表示有，“—”表示无，“±”表示不确定，“++”表示较多

可见受检的 2 株串珠镰刀菌和 2 株胶孢镰刀菌不产生所检的 3 种毒素，4 株谷镰刀菌均不同程度地产生脱氧雪腐镰刀菌烯醇并且其中 3 株还可产生玉米赤霉烯酮，在一株木贼镰刀菌培养物中可能检测到脱氧雪腐镰刀菌烯醇。这些结果需进一步验证。

2.2 气谱—质谱联用分析结果

该方法具有很高的灵敏度，并且能很好地确认其中的毒素，是目前毒素检测中最可靠的方法，分析结果见附表。表明用薄层层析法检测不能确定的 3 个菌株的产毒情况是：禾谷镰刀菌 (11151) 产生玉米赤霉烯酮，禾谷镰刀菌 (10441) 和木贼镰刀菌产生脱氧雪腐镰刀菌烯醇。这几株菌产毒量低，用薄层层析法不能确认。从色谱图上看，相应毒素的色谱峰的确不高。

3 讨 论

在吉林省玉米穗腐病原真菌中串珠镰刀菌及其胶孢镰刀菌比例较高，分别占分离

频率的 53% 和 15%，它们在田间侵染玉米穗粒的致病性和病症都是典型的，但是被检的 2 株串珠镰刀菌及其 2 株胶孢镰刀菌中都没有发现有 3 种毒素产生。禾谷镰刀菌在田间的分离频率不高，仅为 12%，但检测的 4 株禾谷镰刀菌均产生毒素。其中有 3 株即产生玉米赤霉烯酮也产生脱氧雪腐镰刀菌烯醇，另一株只产生脱氧雪腐镰刀菌烯醇。虽然目前吉林省入库玉米中霉烂率仅为千分之几，这个数量可能不会构成人畜中毒，但当仓贮期子粒含水量大会继续霉变，所造成的危害将不可忽视。

参 考 文 献

- 1 章红等. 克山病病区粮食中串珠镰刀菌素的检测. 中华医学杂志, 1994, 74 (9): 562—563
- 2 罗毅. 中国地方病防治杂志, 1992, 7 (2): 71
- 3 朱彤霞等. 玉米赤霉烯酮产生菌在我国的分布及其特性. 真菌学报, 1991, 10 (2): 141—148
- 4 吴小荣等. 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的薄层层析测定法. 微生物学通报, 1990, 17 (2): 116—119