

麦类赤霉病菌毒素的研究

II. 禾谷镰刀菌的固体、液体培养产毒研究

吴经纶 孙冰 王玉琴 孔海明 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所微生物室, 上海)

自然病麦中分离、鉴定的禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) FG-1 接种在固体、液体培养基中, 培养物的粗提取液不但引起试验鸽子的强烈呕吐, 还能抑制豌豆种子的发芽。于变温条件下固体培养, 菌株的产毒能力增加。液体培养则以在 S. P. M. 中的培养物显示的生物毒性最强。从液体培养物中提取的粗制毒素是一个多组分化合物, 柱层层析得到的 6 个组分中以 R_f 值 0.53 部分生物毒性最强, 与已知的赤霉病麦毒素 I (脱氧雪腐镰刀菌烯醇)、II (3-乙酰氧基脱氧雪腐镰刀菌烯醇) 和赤霉烯酮比较, 显示不同的层析现象。根据毒素的生物特性, 它属于单端孢霉烯族毒素中的一个未知成员。

人畜误食霉菌污染粮食引起中毒事故已屡见不鲜, 特别在黄曲霉毒素的致癌作用被证实后, 因霉菌污染造成的危害日益引起人们的重视。以上海地区麦类赤霉病菌调查和产毒菌株的初步研究结果^[1]来看, 进一步研究镰刀菌的培养条件、产毒机制和毒素理化性质是很有必要的。笔者观察了多种固体、液体培养基和温度变化条件对禾谷镰刀菌 FG-1 毒素产生的影响, 对其产生的粗毒素作了初步纯化和分析。

材料与方 法

(一) 菌 株: 与 (I) 报相同。

(二) 培养条件

1. 固体培养: 取健康大、元、小麦粒等容混合后用水漂净, 加水煮沸后放置 20 分钟, 倾去水摊开, 待表面稍干后分装在 5 立升三角瓶中, 每瓶 0.5 立升, 15 磅灭菌 1 小时。经活化的斜面菌种接入种子培养基 (10% 玉米煮出液) 中, 于 28℃ 振荡培养 5 天, 俟其产生大量分生孢子后, 以 5% 接种量 (V/V) 接入大瓶, 置 28℃ 静止培养, 1 周后按下列三个条件继续培养:

(1) 变温培养 (I): 10—15℃ 培养 3 周。

(2) 变温培养 (II): 10—15℃ 培养 10 天后置 28℃ 培养 3 天取出, 15℃ 培养 1 周。

(3) 恒温培养: 28℃ 培养 3 周。

2. 液体培养: 选择了 4 种镰刀菌产毒培养基, 成份见表 1 (主要参照 Mirocha 方法^[2], 其中 S. P. M. 和 Czapek-Dox 培养基中硝酸钠改为硝酸钾)。培养基分装在 5 立升三角瓶中, 每瓶装 750 毫升, 15 磅灭菌 25 分钟。接种量同固体培养。28℃ 振荡培养 2 周。

表 1 镰刀菌的液体产毒培养基成份(升)

培养基	成 份
S. P. M.	蔗糖 50 克, 硝酸钾 20 克, 磷酸二氢钾 5 克, 氯化高铁 0.012 克, 硫酸镁 1.22 克
G. C. Y.	葡萄糖 40 克, 玉米浆 1 克, 酵母膏 2 克
G. P. B.	葡萄糖 10 克, 蛋白胨 10 克, 牛肉膏 3 克
Czapek-Dox	蔗糖 30 克, 氯化钠 60 克, 硝酸钾 20 克, 磷酸二氢钾 1 克, 硫酸镁 0.5 克, 氯化钾 0.5 克

(三) 粗毒素的制备

1. 固体培养物干燥后, 用 10 倍体积乙醇 (85%) 浸泡两次 (每次过夜), 合并两次浸出液, 过

本文于 1979 年 10 月 29 日收到。

本工作承姜广正、陈庆涛和屠传忠三位先生提出宝贵意见, 致以谢忱。

滤。滤液在 70℃ 减压浓缩, 得每毫升含 3—4 克干病麦浸出物之浓缩液, 置冰箱保存备用。

2. 液体培养物滤去菌体的滤液用 2N 盐酸调 pH 至 7.0, 待出现絮状析出物后再过滤, 得紫红色澄清滤液, 70℃ 减压浓缩至原来体积的 1/30—1/50, 置冰箱备用。

(四) 液体培养物的初步纯化

液体培养浓缩物浓缩至干, 用少量甲醇提取, 蒸干后用少量氯仿提取, 蒸去氯仿, 得浅黄色粗毒素。取粗毒素 3 克, 溶于少量氯仿, 拌以 10 克硅胶, 待氯仿挥发后即成为柱层层析上柱样品。取 300 克硅胶置氯仿: 丙酮 (9:1) 混合液中湿上柱 (柱高 120 厘米, 直径 4 厘米), 铺样于柱顶, 依次用表 2 所列溶剂洗脱, 洗脱速度为 2 毫升/分, 每 20 毫升收集 1 管, 共收集 140 管。每隔 3 管点样于 20 × 20 厘米硅胶板上, 用氯仿: 乙醇 (9:1) 溶剂系统展开后, 用 20% 硫酸喷雾显色 (110℃, 20 分钟), 或直接在短波紫外光下进行观察。

表 2 粗毒素柱层析溶剂系统

顺 序	溶 剂	体 积 (毫升)
1	氯仿: 丙酮 (9:1)	600
2	氯仿: 丙酮 (8.5:1.5)	600
3	氯仿: 丙酮 (7.5:2.5)	600
4	氯仿: 乙醇 (1:1)	600
5	乙醇: 水 (8:2)	600

(五) 鸽子致吐试验

1. 固体培养物的毒性试验曾采用分组定量法, 但消耗较多的鸽子和样品。后改为限时追加法, 即每种样品以 2—3 只鸽子为一组进行灌胃, 无反应者可以逐渐增加剂量, 直至呕吐为止, 并记录始吐时间及剂量 (即从第一次灌胃到第一次呕吐的间隔时间及累积剂量)。

2. 液体培养物的毒性试验采用灌胃比值 (R) 来表示毒性强弱, 即将灌胃时所用浓缩液折合培养基的实际毫升数除以鸽子体重克数, 两数相等时为 $R = 1$, R 值愈小, 表明培养液毒性愈强。

(六) 豌豆发芽抑制试验

根据 Burmeister, H. R. 等的方法^[9]。

(七) 家兔皮肤敏感试验

体重 3—4,000 克健康家兔, 将腹侧的毛剃净, 酒精消毒, 划成 4 厘米² 若干方块。用溶于丙酮的样品定量点在方块中间, 一周内观察皮肤的敏感反应。

结 果

(一) 固体培养试验

试验结果表明, 禾谷镰刀菌 FG-1 长期在 28℃ 或变温 (I) 条件下培养, 其提取液都显示很弱的生物毒性, 而变温 (II) 条件下的提取液则具有较强毒性 (表 3)。从培养特性看, 禾谷镰刀菌的气生菌丝很发达、不形成分生孢子, 而同色、木贼等镰刀菌则产生大量分生孢子, 气生菌丝不发达。尽管它们的培养特性不同, 但毒性却基本相同 (表 4)。

(二) 液体培养试验

FG-1 在蔗糖、硝酸钾为唯一碳、氮源的 S. P. M. 培养基中生长良好, 菌体粗壮, 产生大量分生孢子, 其培养物对鸽子显示较强的致吐毒性。在相同碳、氮源的 Czapek-Dox 培养基中不仅生长差 (图 1), 毒性也弱 (表 5)。在葡萄糖为唯一碳源的 G. C. Y. 和 G. P. B. 培养基上, 不仅生长差, 不产孢子, 也不显示生物毒性。表明蔗糖、硝酸盐分别促进禾谷镰刀菌 FG-1 的生长、分生孢子形成与毒素的产生, 而在葡萄糖培养基中则均被抑制。

(三) 产毒菌株的单菌落分离

镰刀菌在形态、生理及致病力等方面的变异现象早有报道^[4]。在禾谷镰刀菌 FG-1 的培养过程中也观察到菌落形态变异和毒力下降等现象。因此在镰刀菌的产毒研究中怎样保持产毒菌株的活性是重要的。我们采用单孢子分离方法获得了较好效果。分离过程中, 选择色泽深紫、生长速度快且均匀的单孢子菌落, 不仅保持了产毒菌株的原有特性, 还提高了它的产毒能

表 3 禾谷镰刀菌 FG-1 在不同温度条件下固体培养物毒性的比较

温 度 条 件	培养时间 (天)	鸽子体重 (克)	鸽子灌胃剂量与次数*				始吐时间 (分)	始吐剂量 (克干病麦/公斤鸽子)
			1	2	3	4		
28℃	30	328	15	10	10	10	—	—
		328	15	10	10	10	—	—
	45	315	15	10	10	10	93	45
		400	15	10	10	10	—	—
变温 I	30	260	15	10	10	10	—	—
		337	15	10	10	10	—	—
	45	298	15	10	10	—	61	35
		415	15	10	10	—	65	35
变温 II	30	440	15	10	—	—	60	25
		350	15	10	10	—	75	35
	45	310	15	10	—	—	52	25
		345	15	—	—	—	13	15

* 表示每半小时追加的克干病麦/公斤鸽子,一俟发生呕吐,即停止追加。

表 4 不同镰刀菌在变温 II 条件下的培养特性与毒性比较

菌 株	培养特性	鸽子体重 (克)	鸽子灌胃剂量与次数				始吐时间 (分)	始吐剂量 (克干病麦/公斤鸽子)
			1	2	3	4		
FG-1	气生菌丝发达,不产孢	351	15	5	—	—	55	20
		295	15	5	5	—	73	25
FG-2	同 上	281	15	5	5	—	84	25
		346	15	5	—	—	54	20
FG-3	同 上	277	15	5	5	5	—	—
		312	15	—	—	—	18	15
FC-1	气生菌丝不发达,产孢	367	15	—	—	—	29	15
		351	15	5	5	—	76	25
FS-1	同 上	315	15	5	—	—	43	20
		396	15	—	—	—	26	15
FE-1	同 上	370	15	5	5	5	—	—
		300	15	5	5	—	80	25

力(表 6)(未进行单孢子分离时,鸽子致吐试验的 R 值都在 1.0 以上)。当比值 R 降低至 0.1 时还能引起鸽子的呕吐。

(四) 粗毒素的纯化

禾谷镰刀菌 FG-1 液体培养 (S. P. M.) 的粗毒素柱层析和薄层析表明,它是

表 5 禾谷镰刀菌 FG-1 在不同液体培养基中的培养特性和毒性比较*

培养基	培 养 特 性 (96 小时)			鸽子致吐毒性试验 (每组 3 只) R = 1.0
	生 长 (毫克/毫升)	色 泽	镜 检	
S. P. M.	18.7	深 紫 红	菌体粗壮,内含物多,大量分生孢子	3/3
G. C. Y.	2.8	紫 色	菌体细絮状,结团,不产孢	0/3
G. P. B.	7.6	高 铁 黄	菌体细絮状,不产孢	0/3
Czapek-Dox	9.6	褐 色	菌体粗壮,较多分生孢子	1/3

* 液体振荡培养两周。

表 6 禾谷镰刀菌 FG-1 经孢子分离后液体培养的致吐毒性

培养基	培养时间	灌胃比值	鸽子致吐试验 (每组 3 只)
S. P. M.	两 周	R = 0.1	1/3
		R = 0.3	2/3
		R = 0.5	3/3
		R = 0.7	3/3

此外, FG-1 在液体培养过程中还产生一种对四联球菌有明显拮抗作用的物质(图3),其 R_i 值高于其它组分,紫外光下显示天蓝色的萤光(图 2 中的虚线点部分)。

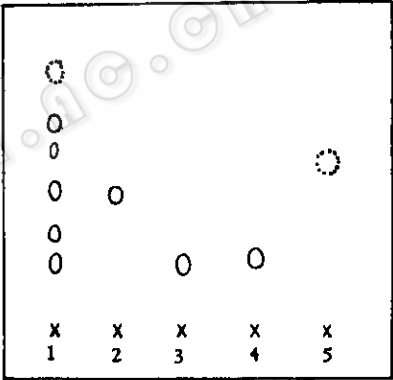


图 2 几种赤霉病菌毒素的薄板层析比较
(氯仿:乙醇=9:1)

1. FG-1 粗毒素。 2. 柱层析分离后的第三组合。
3. 赤霉病麦毒素 I。 4. 赤霉病麦毒素 II。 5. 赤霉烯酮。

表 7 禾谷镰刀菌 FG-1 液体培养粗毒素(3克)柱层析分离后各组份的毒性试验

柱层析分离后的组份	分部收集的管数	回收(毫克)	家兔皮肤敏感试验 (1.2毫克/块)	豌豆发芽抑制试验 (2.4毫克/毫升)
1	1—18	713.6	无 反 应	70/100
2	19—38	311.1	无 反 应	80/100
3	39—50	64.7	严重红肿	40/100
4	51—82	67.2	无 反 应	80/100
5	83—128	139.9	无 反 应	80/100
6	129—140	285.8	无 反 应	90/100

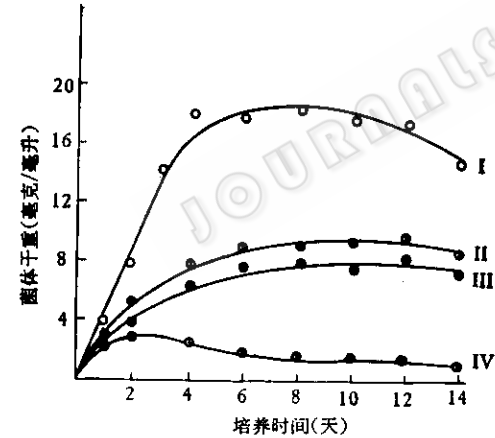


图 1 不同液体培养基对禾谷镰刀菌 FG-1 生长的影响
I. S. P. M. II. Czapek-Dox
III. G. C. Y. IV. G. P. B.

一个多组分化合物(图 2)。硅胶柱层析所得的 6 个组分中以第 3 部分生物毒性最强(表 7)。它与已知的赤霉病麦毒素 A、B 及赤霉烯酮比较(此 3 种毒素由中国科学院上海有机化学研究所及上海粮食科学研究所提供),在薄层析上有较大的差别(图 2)。

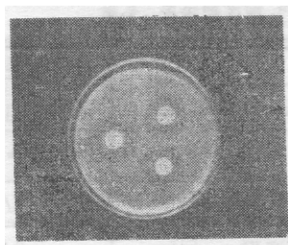


图3 禾谷镰刀菌 FG-1 的一种产物
对四联球菌的拮抗作用

讨 论

在固体培养中, 恒温 and 变温 (I) 条件下仅产生很弱的致吐毒性, 而变温条件 II 却能使菌株的产毒能力提高一倍左右, 培养周期也较短。文献报道, 镰刀菌在实验室条件下进行培养时, 经过低温阶段能提高菌株的产毒能力^[5]。有人则认为被镰刀菌感染的麦穗经过寒温交替变化促进了分生孢子形成, 而后者与毒素产生有关。但在禾谷镰刀菌 FG-1 的各种变温条件下培养, 均未见分生孢子的形成。可见在固体培养时, 温度变化是影响镰刀菌产毒的重要因素, 分生孢子形成仅仅是镰刀菌种间的差异。

液体培养表明, 碳、氮源对 FG-1 的培养特性和产毒的影响是明显的。蔗糖和硝酸钾促进了菌体的生长和分生孢子形成, 而葡萄糖却产生了抑制作用。这与 Bonn 等^[6]报道的结果是一致的。可见以蔗糖为碳源的 S. P. M. 培养基作为产毒培养基是合适的。

有关镰刀菌毒素研究国外已有报道^[5,7], 国内也已从天然病麦中进行分离、纯化, 并已取得毒素结晶。上述报道内容多数是不同镰刀菌产生的具有基本化学结构 [12, 13 环氧- Δ^9 -单端孢霉烯 (12, 13-epoxy- Δ^9 -trichothecene)] 的单端孢霉烯族毒素; 如三线镰刀菌 (*F. tricinatum*) 产生的 T-2 毒素^[8], 雪腐镰刀菌 (*F. nivale*) 产

生的雪腐镰刀菌烯醇等^[9]。这类毒素均具有引起哺乳类动物和家禽的呕吐、抑制豌豆发芽和皮肤敏感反应的特性。FG-1 液体培养表明, 它的粗毒素是一个多组分化合物, 柱层析的 6 个组分中以第三组分 (R_f 0.53) 生物毒性最强 (图 4, 表 7)。与已知毒素 I、II 比较, 薄层析中显示不同的 R_f 值 (分别为 0.53, 0.29, 0.31), 硫酸显色的颜色反应也不同, 前者从浅棕色到棕色, 后两者分别从玫瑰紫到灰色和淡黄色到桔黄色。虽然它们的理化性质有所区别, 但从生物毒性看都属于单端孢霉烯族化合物。我们认为, 第 3 组分是人工培养产生的未知的单端孢霉烯族化合物中一个成员。此外, 粗毒素的其它组分虽然毒性很弱, 但 R_f 值都较接近, 硫酸显色呈淡红、黄色到棕色, 可能属于同一基本化学结构的衍生物, 值得深入研究。

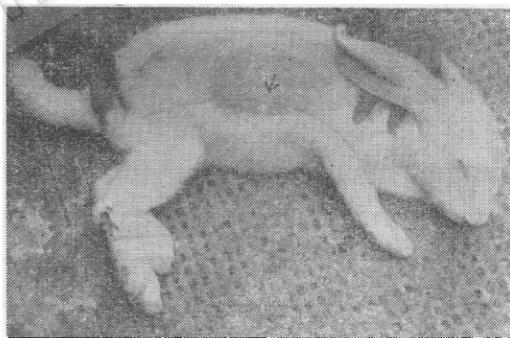


图4 柱层析分离的第三组分样品, 引起家兔皮肤的严重红肿(箭头所指)

参 考 文 献

- [1] 王玉琴等: 微生物学通报, 待发表。
- [2] Mirocha, C. J.: *Biotech. Bioeng.*, 10: 469, 1968.
- [3] Burmeister, H. R. et al.: *appl. Microbiol.*, 20: 437, 1971.
- [4] 李克昌: 《小麦赤霉病及其防治》, 科学出版社, 北京, 18 页, 1965 年。
- [5] Mirocha, C. J. et al.: *Microbial toxins*, VII. Kadis, S. et al. eds., p. 107, Academic press, 1971.
- [6] Bonn, W. G. et al.: *Can. J. Botany*, 48: 1335, 1970.

- [7] Bamberg, J. R.: *Mycotoxin and Other Fungal Related Foods Problems*. Rodrics, J. V. ed., p. 144, 1976.
- [8] Burmeister, H. R.: *Appl. Microbiol.*, 21:

739, 1971.

- [9] Mirocha, C. J.: *Biotech. Bioeng.*, 10: 469, 1968.

STUDIES ON THE TOXINS OF *GIBBERELLA ZEAE* (SCHW.) PECTH

II. TOXINGENIC STUDIES OF *FUSARIUM GRAMINEARUM* FG-1 IN SOLID AND LIQUID CULTURES

Wu Jinglun Sun Bing Wang Yugin

Kong Haiming Chiao Juishen

(Department of Microbiology, Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica)

Fusarium graminearum FG-1 isolated and identified from infected wheat crops were inoculated on solid and liquid media. The crude toxins isolated from these cultures caused not only violent emesis on the test pigeons, but also inhibited the germination of green peas. The results on solid media showed that the toxigenicity of the cultures could be increased by varying the incubation temperature. Toxicity potency from the S. P. M. medium was the highest, and the crude toxin contained multiple components. After fractionation

by column chromatography six components were separated, and the biological toxicity of the fraction 3 (R_f value 0.53) was the strongest. This fraction is different from those of deoxynivalenol, 3-lactoxydeoxynivalenol and zearalenone on thin layer chromatographic analysis. According to the biological characters of this toxin, it is possible that this fraction may represent an unknown member of trichothecene toxins, and further characterization of it is worthwhile.