

三线镰刀菌 M-20 液体培养产毒的初步研究

匡开源

张树荣

(上海市农业科学院植物保护研究所)

(上海师范大学实验中心)

摘要 本文研究了三线镰刀菌 M-20 液体培养的产毒性。该菌株分别接种于 PSC、GMG 和 SPM 液体培养基以及碎玉米培养基内,培养物用豌豆发芽抑制法测定毒性和高效液相测定 T-2 毒素,结果表明, M-20 菌株在 GMG 液体培养基于 8 和 19℃ 下培养 24 天,其产毒最为合适。

关键词 三线镰刀菌;液体培养;产毒性;T-2 毒素

镰刀菌属 (*Fusarium*) 是一类危害田间麦类、玉米和库贮谷物的致病真菌,病粒产生毒素,引起人畜镰刀菌毒素中毒,产生 T-2 毒素的镰刀菌株的产毒性,除固体发酵培养外, Ueno, Mirocha 和 Ellison 等报道了液体静置发酵培养^[1-3],国内尚未见液体培养产生 T-2 毒素的报告。

三线镰刀菌 M-20 (*F. tricinctum* M-20) 是一株产毒性强的菌株,其固体培养制备的粗毒物,抑制豌豆发芽率为 96—100%,家兔皮肤反应呈红肿及溃烂,经研究证实其为 T-2 毒素,并测定 T-2 毒素含量较高,产毒性稳定^[4-5]。基于预防医学、食品卫生和粮食等研究需要,本文报告三线镰刀菌 M-20 液体培养的产毒研究。

材料与方 法

(一) 菌株

三线镰刀菌 M-20 (以下简称 M-20)。

(二) 培养基和培养条件

1. 液体培养基: 选取 3 种三线镰刀菌产毒静置培养基,成分见表 1。培养基在 1 kg/cm²

表 1 M-20 液体产毒培养基成分 (L¹)

培养基	成 分
PSC	蔗糖 30g、硝酸钠 3g、磷酸氢二钾 1g、氯化钾 0.5g、硫酸镁 0.5g、蛋白胨 10g、硫酸亚铁 0.01 g。
GMG	黄豆粉 20g、葡萄糖 100g、玉米浆 5g。
SPM	蔗糖 50g、硝酸钾 20g、磷酸二氢钾 5g、氯化亚铁 0.012g、硫酸镁 1.22g。

高压湿热灭菌 25 分钟。

2. 产毒培养: M-20 菌株接种在 PDA 培养基平板上 (25℃ 培养 2 周),用打孔器取直径为 0.8 cm 的圆形菌块,接入装有 100 ml 培养基的 250 ml 三角烧瓶内 (每瓶接种 3 菌块),每个培养基接 3 瓶,分别在 8 和 19℃ 下培养 24 天。

谷物基质试验中,在 250 ml 三角烧瓶内盛有 75 g 的碎玉米粒,经高压消毒接种后 8℃ 培养 24 天。

(三) 粗提物的制备

M-20 菌培养液经滤纸过滤,菌丝体用水洗净,于 60—70℃ 干燥过夜,称重;滤液用等量的乙酸乙酯抽提,抽提液经真空减压浓缩或风干得粗毒素。玉米培养物在烘干称重后,用乙酸乙酯浸泡,滤液浓缩后即得粗毒素^[4]。以上均制成毒素丙酮液,置冰箱备用。

(四) 毒性生物学测定

毒性测定用豌豆发芽抑制试验方法^[4],测定浓度为 2.5 ml 培养液/ml。

(五) 高效液相 HPLC 分析毒素测定

浓缩的培养物加 1 ml 甲醇 (HPLC 级) 溶解, Waters 高效液相色谱定量测定, C₁₈ 径向柱, UV 检测 214 nm, 65% 甲醇-水移动向,流速为 1 ml/min。

结 果

比较了 M-20 在 3 种液体培养基中菌丝生

夏其明同志参加部分工作,致谢。

长、豌豆发芽率测定和 T-2 毒素的产生, 结果见表 2。

表 2 M-20 在液体培养中产毒性的比较

培养条件	培养基	菌丝干重 (g/L)	豌豆发芽率* (%)	T-2 毒素**
19℃ 24d	PSC	12.13	35.66 A	— — 土
	GMG	22.88	0 B	+
	SPM	20.45	14.37 AB	— — 土
8℃ 24d	PSC	12.21	9.35 B	+
	GMG	24.22	0 B	土 — +
	SPM	7.11	49.41 A	— — 土
	玉米		0	土 — +

* 具有相同字母的平均值在 1% 水平上无显著差异, 平均值的比较用邓肯氏多重范围测试。

** 表示作为 T-2 毒素的相对含量。“—”未检出; “土”可疑; “+”检出。

由表 2 看出, 葡萄糖、黄豆粉和玉米浆为碳、氮源的 GMG 培养基中, 菌丝生长良好, 培养物对豌豆发芽有强毒性的生物效应。在以蔗糖和硝酸盐为碳、氮源的 PSC 和 SPM 培养基上, 仅 PSC 在 8℃ 培养下有强毒性生物效应, 其他条件下则毒性较弱。豌豆发芽率的统计分析表明, M-20 在温度和培养基相互作用差异明显。M-20 粗提物用高效液相层析测定 T-2 毒素的相对含量, 在 GMG 培养基和 8℃ 下的 PSC 培养基中可检出 T-2 毒素, 在其他条件下则为未见或可疑。

讨 论

M-20 在 GMG 和 8℃ 下 PSC 培养基中可检出 T-2 毒素, 而在其他条件如 SPM 培养基中未被检出, 这可能与不同镰刀菌种在不同的培养条件下产毒性的差异有关。

M-20 以葡萄糖、黄豆粉和玉米浆为碳、氮源的 GMG 培养基, 在 8 和 19℃ 下培养 24 天后产生 T-2 毒素是合适的, 这与 Cullen 等报道三线镰刀菌在 GMG 中 19℃ 培养 24 天时产生大量的 T-2 毒素^[6], 以及 Bamburg 等报道三线镰刀菌在玉米浆、黄豆粉为基础 (Gregorg's) 培养基 8℃ 培养 30 天可以较好的产生毒素相一致^[7]。

M-20 液体培养制备粗毒素进行豌豆发芽率试验, 测定生物毒性效应, 与 HPLC 测定结果基本相符, 表明了 M-20 不仅在固体培养基上产生 T-2 毒素, 而且在液体培养基上也可产生。三线镰刀菌等这类单端孢霉毒素均具有抑制植物种子发芽的生物毒性效应, 因此, 它可作为产毒研究的初步测定。Ueno 等报道镰刀菌种在半合成培养基中, 25—27℃ 振荡培养可产生 T-2 毒素, 并对毒素的产生时间、过程和葡萄糖的浓度等进行了研究^[3]。关于 M-20 的液体培养产毒性还有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Ueno, Y. et al.: *Japan J. Exp. Med.*, **42**: 661, 1972.
- [2] Mirocha, C. J. and Pathre, S.: *Appl. Microbiol.*, **26**: 719, 1973.
- [3] Ellison, R. A. and Kocsonis, F. N.: *Appl. Microbiol.* **26**: 540, 1972.
- [4] 匡开源等: *真菌学报*, **4** (3): 193—196, 1985.
- [5] 张树荣等: *真菌学报*, **4** (4): 255—259, 1985.
- [6] Cullen, D. et al.: *Applied and Environmental Microbiol.*, **44** (2): 371—375, 1982.
- [7] Bamburg, J. R. et al.: *Biotechnol. Bioeng.* **10**: 445, 1968.
- [8] Ueno, Y. et al.: *Appl. Microbiol.*, **30**(1): 4—9, 1975.