

小麦脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON) 快速筛查方法的研究

欧阳毅,唐芳,张海洋,祁智慧,程树峰

(国家粮食局科学研究院,北京 100037)

摘要:基于脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)产毒菌镰刀菌形态特征,以其大型分生孢子为检测目标物,初步建立一种新的小麦DON筛查方法。样品直接用水振荡提取,100目滤布过滤,滤液于显微镜下镜检。检测时间约3 min。对不同感染水平的小麦阳性样品进行镰刀菌大孢子检验($n=6$),方法相对标准偏差(RSD)为7.1%~21.6%。对我国小麦主产区的72个小麦样品进行检验,用HPLC法作对照。结果表明,样品中有46个未检出镰刀菌大孢子,占样品总数的63.9%,这些样品DON含量为0~792.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,均未超过国家限量标准1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$;有26个样品检出大孢子,DON未超标为6个,但均有检出,其余大部分样品镰刀菌生长量与其产生DON的产量呈正相关。由此可见,通过本方法,可快速的对批量小麦DON超标与未超标样品进行筛查区分。

关键词:小麦DON;筛查;镰刀菌大孢子

中图分类号:TS 211.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2016)05-0073-04

Research on rapid screening method for deoxynivalenol (DON) in wheat

OUYANG - yi, TANG Fang, ZHANG Hai - yang, QI Zhi - hui, CHENG Shu - feng

(Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037)

Abstract: A new deoxynivalenol (DON) detection method which based on the morphological characteristic of fusarium that produces DON in wheat was preliminary set up. Fusarium conidiophores were the detected target of this method. The spores in the samples were oscillated in water, filtered with 100 mesh filter cloth and the spores in the filtrate were microscopic tested using a microscope. The whole process takes three minutes. The relative standard deviation (RSD) of the wheat positive samples test ($n=6$) with different infection levels was 7.1%~21.6%. 72 wheat samples collected from main wheat producing areas in China were inspected by this method, and the HPLC method was used as the control. The results showed that fusarium conidiophores were nearly not found in 46 samples, account for 63.9% of the total samples, in which DON concentration range were 0~792.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ which did not exceed the limitation of national standard 1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The fusarium conidiophores were detected in 26 samples, in which DON were not exceed the limitation in 6 samples, and the growth of fusarium was positively related to the yield of DON. The small batch of wheat can be quickly screened out by this method whether exceeding the DON limitation standard.

Key words: DON in wheat; screen; megaspore of fusarium

小麦脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)是由多种镰刀菌产生的一种单端孢霉烯族类化合物,其中以禾谷镰刀菌占绝对优势,据国内17省市采样分析,该种占93%,其次为燕麦镰刀菌^[1]。在我国小麦DON污染十分普遍,主要发生于长江中下游的江苏、浙江、安徽、湖北及东北垦区,近年来,污染区域

逐年扩大,已波及黄淮海和西北等广大冬麦区。由于小麦DON污染涉及面广、危害性大,已引起国家相关管理部门的高度关注。我国现行的小麦和小麦粉中DON国家限量标准规定,DON含量不得超过1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2]。这对于保障我国粮食安全是十分必要的。

小麦DON检验在我国是一项经常性的工作。它的特点是样品量大,检测时间长,费用高,并需要大型分析仪器。采用一种简单、快速、经济的筛查方

收稿日期:2016-03-18

作者简介:欧阳毅,1987年,女,助理研究员。

通讯作者:唐芳,1978年,女,副研究员。

法,将大量未超标小麦样品

从被检样品中分离,不仅可大大提高工作效率,也可解决我国小麦 DON 分析成本过高的问题。目前,国内外对真菌毒素快速检测方法研究甚多,主要集中在酶联免疫法(ELISA)^[3]、免疫胶体金技术^[4]、基因芯片^[5]以及液相芯片^[6]等,有些方法技术上趋于成熟,但仪器设备昂贵、检测成本高等限制,用于大量样品的快速筛查仍存在较大困难。近十几年,我国在镰刀菌产生 DON 毒素规律上也进行了大量研究,王裕中^[7]等从我国苏、浙、皖、闽、川、豫、冀、陕、黑等 11 个省市收集赤霉病穗分离获得的 40 多种禾谷镰刀菌,通过不同菌株产毒能力的测定,结果表明,所有禾谷镰刀菌均有产毒能力。谢茂昌^[8]等研究表明,小麦赤霉病发病程度与 DON 产量之间存在极显著相关性。Miller 等研究表明^[9],镰刀菌产生 DON 的产量与镰刀菌生长量呈正相关。前人大量研究表明,小麦 DON 污染程度与镰刀菌生长密切相关。本实验基于产毒镰刀菌生长形态特征,尝试以镰刀菌大孢子为检测目标物,建立一种小麦 DON 污染快速筛查的新方法,为小麦收购过程中现场快速筛查方法的研究提供一个新思路。

1 材料与方法

1.1 样品

小麦:来自于黄淮小麦主产区。

1.2 试剂和仪器

SMART 双目生物显微镜:重庆奥特公司;PL403-IC 电子天平:上海 Mettler-Toledo 公司;血球计数板:上海求精生化试剂仪器公司;LC-10AT 高效液相色谱仪:日本 SHIMADZU 公司。实验用水为 Millipore 制备的超纯水。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

取 10.0 g 小麦样品,于 80 mL 试管中,加入 30 mL 水,加塞,剧烈振荡 1.5 min,用 100 目滤布过滤,收集滤液备用。

1.3.2 孢子计数

用滴管取少量上述收集液,采用虹吸方法将提取液加入血球计数板中,在 160× 显微镜下进行孢子计数。

1.3.3 HPLC 小麦 DON 检测方法^[10]

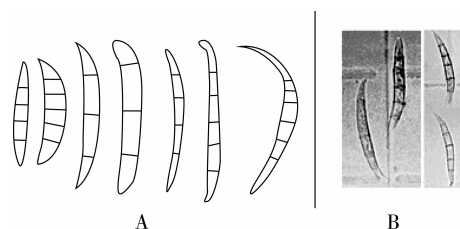
小麦 DON 检测方法按文献^[10]进行测定。

2 结果与分析

2.1 镰刀菌孢子特征

自然条件下小麦等作物感染镰刀菌,初期多附着在粮粒表面生长,按方法 1.3.1 对样品进行处理,可将粮粒表面感染的镰刀菌孢子清洗到提取液中。

镰刀菌生长大多为无性繁殖,主要是在菌丝上长出分生孢子,这些孢子形状各异,主要分为小型分生孢子和大型分生孢子。小孢子形状多,体积小,不易辨认。而大分生孢子体积大,形状较为单一,多呈镰刀形,有 3~10 隔,特征明显显微镜下观察辨认,如图 1(A-B)所示。因此,可对提取液中大孢子进行计数,进而反映 DON 污染情况。



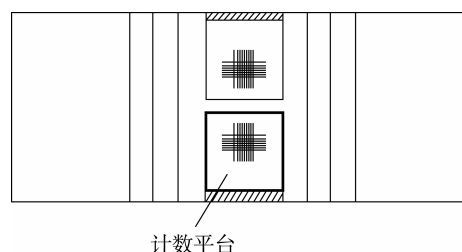
A. 大型分生孢子形态;

B. 光学显微镜下镰刀菌大型分生孢子形态

图1 镰刀菌大型分生孢子形态图

2.2 计数方法说明

自然污染小麦样品按方法 1.3.1 提取后,按方法 1.3.2 对提取液中大孢子镜检计数。由于大孢子一般较长(十几微米到几十微米),远大于细菌和酵母,仅对标准血球计数板计数区中的孢子进行计数,会给计数结果带来较大的误差,因此,在原有计数方法的基础上加以改进,对整个计数平台中的镰刀菌大孢子进行计数,计数体积约为 6 mm³ 如图 2 所示。



计数平台

图2 镰刀菌孢子计数平台

2.3 样品提取条件优化

分别称取 10、15、20 g 被感染的小麦样品,按照 1.3.1 步骤,进行小麦样品前处理,显微镜下镰刀菌大孢子计数,每个样品三次重复,取平均值,结果如图 3 所示,随着样品重量的增加,镰刀菌孢子计数结

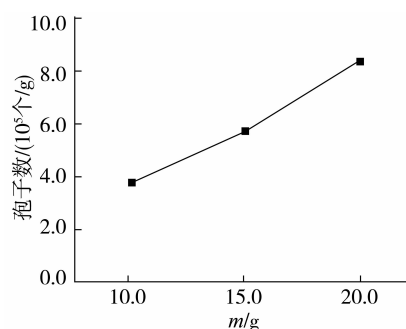


图3 样品称样量优化

果也梯度增长,不同称样量对样品镰刀菌孢子计数的结果无明显影响,本实验中样品称样量定为 10 g。

同样操作步骤,提取时间分别为 1.0、1.5、2.0、3.0 min,并对提取液进行显微镜计数,结果如图 4 所示,提取时间为 1.0 min 时镰刀菌孢子提取不充分,提取时间在 1.5 min 以上时小麦样品中镰刀菌孢子计数结果无明显的影响,镰刀菌孢子浓度均为 4.0×10^5 个/g,因此本方法将提取时间定为 1.5 min。

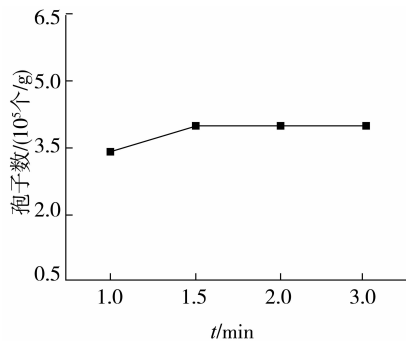


图 4 样品提取时间优化

选择 80、100、200、300、400 目孔径的滤布对过滤条件进行优化,其他操作步骤按照 1.3.1 步骤,结果如图 5 所示,80、100 目孔径滤布对镰刀菌孢子计

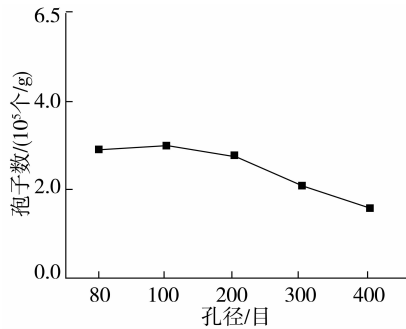


图 5 滤布孔径优化

数结果无明显影响,镰刀菌孢子浓度在 $2.9 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^5$ 个/g 之间,200、300、400 目滤布随孔径变小,镰刀菌孢子数逐渐减少。由于孔径大的滤布,提取液过滤时,通过滤布的杂质也较多,对镜检计数视野有影响,因此本方法选择孔径 100 目滤布。

2.4 精密度

选择三个水平感染的小麦样品,按方法 1.3.1 对样品进行处理,并进行镰刀菌大孢子计数,结果见表 1。

表 1 方法精密度试验结果 (n=6)			
次数	镰刀菌孢子/(10 ⁵ 个/g)		
	1	2	3
1	1.6	4.1	6.2
2	1.4	4.2	6.2
3	1.5	4.6	5.7
4	2.4	4.7	6.9
5	2.0	3.9	4.9
6	1.6	4.3	5.5
$\bar{x}$	1.8	4.3	5.9
RSD/%	21.6	7.1	11.8

由表 1 可知,三个感染梯度小麦样品,六次重复,相对标准偏差(RSD)为 7.1 %~21.6 %。这一结果对于微生物常规检验,误差处于一个较低的水平。由此可看出,本方法具有较好的重复性。

2.5 样品测定结果对比

按方法 1.3.1 和 1.3.2,对从我国黄淮小麦主产区收集 72 份样品进行处理,并对镰刀菌大孢子计数,同时按 1.3.3 对每个样品进行色谱定量检测,检测结果见表 2。

表 2 镰刀菌大孢子计数结果与 HPLC 检测结果对比								
样品	DON 含量 /($\mu\text{g/kg}$)	孢子数 /(10 ⁵ 个/g)	样品	DON 含量 /($\mu\text{g/kg}$)	孢子数 /(10 ⁵ 个/g)	样品	DON 含量 /($\mu\text{g/kg}$)	孢子数 /(10 ⁵ 个/g)
1	0.0	0.0	25	0.0	0.0	49	1 896.7	2.0
2	0.0	0.0	26	0.0	0.0	50	1 672.2	3.0
3	0.0	0.0	27	0.0	0.0	51	1 826.1	3.5
4	0.0	0.0	28	0.0	0.0	52	914.1	4.5
5	0.0	0.0	29	0.0	0.0	53	1 746.1	5.5
6	0.0	0.0	30	0.0	0.0	54	2 305.9	6.5
7	0.0	0.0	31	0.0	0.0	55	402.0	7.5
8	0.0	0.0	32	0.0	0.0	56	1 639.2	8.6
9	0.0	0.0	33	384.8	0.0	57	2 541.6	11.1
10	0.0	0.0	34	389.7	0.0	58	2 676.5	13.1
11	0.0	0.0	35	412.1	0.0	59	764.1	14.1
12	0.0	0.0	36	447.1	0.0	60	2 291.5	15.1
13	0.0	0.0	37	523.2	0.0	61	814.4	20.1
14	0.0	0.0	38	524.3	0.0	62	2 862.4	21.1
15	0.0	0.0	39	642.6	0.0	63	2 496.3	23.1
16	0.0	0.0	40	660.0	0.0	64	3 555.5	27.7
17	0.0	0.0	41	661.1	0.0	65	3 775.7	30.7
18	0.0	0.0	42	691.5	0.0	66	741.2	32.2
19	0.0	0.0	43	766.5	0.0	67	3 814.5	47.3

续表								
样品	DON 含量 /(μg/kg)	孢子数 /(10 ⁵ 个/g)	样品	DON 含量 /(μg/kg)	孢子数 /(10 ⁵ 个/g)	样品	DON 含量 /(μg/kg)	孢子数 /(10 ⁵ 个/g)
20	0.0	0.0	44	767.1	0.0	68	4 350.2	52.8
21	0.0	0.0	45	770.2	0.0	69	3 517.8	62.4
22	0.0	0.0	46	792.4	0.0	70	2 304.2	86.0
23	0.0	0.0	47	517.4	1.0	71	3 601.5	191.6
24	0.0	0.0	48	1102.9	1.0	72	4 105.4	285.2

将镰刀菌计数大孢子计数结果与 HPLC 定量检测结果进行比较。72 个小麦样品中,46 个样品未检出镰刀菌大孢子,占小麦样品的 63.9%,这 46 个样品中,有 32 个样品 DON 未检出,14 个样品 DON 检出范围在 384.8 ~ 792.4 μg/kg,均值在 602.3 μg/kg,远低于国家限量标准 1 000 μg/kg。分析原因,显微镜计数法是通过剧烈振荡提取得到镰刀菌大孢子悬浮液,计数结果为未检出,并不代表镰刀菌完全不生长,只是生长量少,孢子浓度在显微计数法检出限以下,产生的 DON 毒素也相应要低得多,从现有数据来看,远低于国家限量标准,初步可以确定,镰刀菌大孢子未检出的情况下 DON 毒素含量不超标。显微镜计数法的检出限量值还需进一步检测不同地区的大量样品加以确认。

镰刀菌大孢子检出样品共有 26 个,其中 6 个样品虽有检出,但 DON 含量不超标,占阳性样品的 23.1%,应属毒素产量较低的镰刀菌种。其余 20 个样品均已超过国家限量标准,在这 20 个样品中,有 3 个样品大孢子检出量非常高,但毒素含量没有明显升高,也应属毒素产量低的镰刀菌种。其余 17 个样品污染的镰刀菌产毒水平大致相同,对大孢子检出量与 DON 含量进行相关性分析,得到线性回归方法为 $Y = 43.327 X + 1\,739.9$,相关系数 R 可达 0.882(图 6),进一步验证了镰刀菌产生 DON 的量与镰刀菌生长量呈正相关的结论。

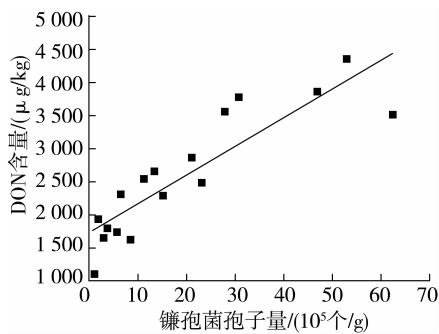


图 6 镰刀菌大孢子检出量与 DON 含量回归曲线

3 结论

对小麦样品中镰刀菌孢子的提取条件进行了优化,最佳样品提取条件为:样品称取量 10 g,提取时间 1.5 min,滤布孔径 100 目。对小麦样品进行了重复性实验(n = 6),相对标准偏差(RSD%)范围在

7.1%~21.6%,对微生物常规检测方法而言,本方法具有良好的重复性。

在小麦主产区 72 个样品(来自 16 个地区的样品)的基础上,对镰刀菌大孢子的数量与 DON 毒素含量的关系进行分析,结果表明,样品中有 46 个未检出镰刀菌大孢子,占样品总数的 63.9%,这些样品 DON 含量为 384.8 ~ 792.4 μg/kg,均未超过国家限量标准 1000 μg/kg;有 26 个样品检出大孢子, DON 未超标为 6 个,但镰刀菌大孢子均有检出,且镰刀菌生长量与其产生 DON 的产量呈正相关。因此,可初步确认显微镜下大孢子未检出时,DON 毒素低于国家限量标准,本方法可快速的对批量小麦 DON 超标与未超标样品进行筛查区分。

所需检测仪器(国产显微镜即可满足检测要求)价格低、携带方便,操作成本低,单个样品低于 1 元钱,操作简单快速,单个样品检测时间 3 min 左右,可满足粮食收购中现场快速筛查的需要,为小麦 DON 毒素的快速筛查方法提供了一个新的研究思路。

参考文献:

[1]金善宝. 中国小麦学[M]. 北京:中国农业出版社. 1996:797 - 800

[2]GB2761—2005,食品中真菌毒素限量[S]. 北京:中国标准出版社,2005.

[3]李华,祭芳,徐剑宏,王裕中,史建荣. 赤霉毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)酶联免疫检测方法研究[J]. 中国农业科学,2007, 40(4):721 - 726.

[4]张道宏,李培武,张奇,张文,丁小霞,王秀嫔,姜俊. 污染粮油食品的主要真菌毒素及胶体金免疫层析技术在快速检测中的应用[J]. 中国油料作物学报,2010,32(4): 577 - 582.

[5]杨锡辉,孔维军,杨美华,赵明,欧阳臻. 适配子识别技术在真菌毒素快速分析中的应用[J]. 分析化学,2013,2(41):297 - 306.

[6]宋慧君,刘淑艳,马惠蕊,蒋丹,曹远根. 液相芯片竞争法检测黄曲霉毒素 B1[J]. 中国农学通报,2011,27(26): 144 - 150.

[7]王裕中,米勒 J D. 中国小麦赤霉病菌优势种—禾谷镰刀菌产毒素能力的研究[J]. 真菌学报,1994,13(3):229 - 234.

[8]谢茂昌,王明祖. 小麦赤霉病发病程度与 DON 含量的关系[J]. 植物病理学报,1999,29(1):41 - 44.

[9]Miller J D, Young J C, Sampson D R. Deoxynivalenol and Fusarium head blight resistance in spring cereals[J]. Journal of Phytopathology, 2010,113(4): 359 - 367.

[10]GB/T 23503—2009,食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱层析净化高效液相色谱法[S].