

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2024.02.017

和肖营, 何岩, 顾雨熹, 等. 小麦中致病真菌的分离鉴定及熏蒸对其毒力的影响[J]. 粮油食品科技, 2024, 32(2): 136-144.

HE X Y, HE Y, GU Y X, et al. Isolation and identification of pathogenic fungi in wheat and influence of fumigation on their virulence[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2024, 32(2): 136-144.

# 小麦中致病真菌的分离鉴定及熏蒸对其毒力的影响

和肖营<sup>1</sup>, 何岩<sup>2</sup>, 顾雨熹<sup>3</sup>, 王锦<sup>3</sup>, 陈晋莹<sup>3</sup>✉

(1. 中储粮江苏质检中心有限公司杭州分公司, 浙江 杭州 310000;

2. 中储粮吉林质检中心有限公司, 吉林 长春 130000;

3. 中储粮成都储藏研究院有限公司, 四川 成都 610000)

**摘要:** 小麦受镰刀菌的感染会导致赤霉病、真菌毒素污染和减产, 镰刀菌对粮食安全有着严重威胁。通过对小麦中镰刀菌株进行分离鉴定, 分离出的三种菌株 N1、N2、N3 分别属于禾谷镰刀菌属、亚洲镰刀菌属和高秆镰刀菌属。利用产毒基因检测和真菌毒素检测对三株菌株玉米赤霉烯酮、呕吐毒素和伏马毒素的产毒情况进行分析, 结果一致显示 N1 和 N3 能产生玉米赤霉烯酮和呕吐毒素, 均含有 PSK 和 Tri5 两种产毒基因, 而 N2 不产生这三种毒素。进一步通过臭氧和二氧化氯进行气体熏蒸, 探究气体熏蒸对分离出的三株菌株的影响, 通过观察孢子形态、菌丝体长度、菌丝形态, 结果表明二氧化氯熏蒸能有效抑制菌丝生长和孢子萌发, 低浓度二氧化氯 (300 mg/L) 处理 0.5 h, 可明显抑制菌丝的生长。而臭氧只能抑制孢子萌发, 对菌丝的生长没有明显的抑制作用。

**关键词:** 镰刀菌; 产毒能力; 真菌毒素; 二氧化氯; 臭氧; 熏蒸

中图分类号: TS255.1; S-3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2024)02-0136-09

网络首发时间: 2024-03-02 19:45:41

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.3863.ts.20240229.1916.004>

## Isolation and Identification of Pathogenic Fungi in Wheat and Influence of Fumigation on Their Virulence

HE Xiao-ying<sup>1</sup>, HE Yan<sup>2</sup>, GU Yu-xi<sup>3</sup>, WANG Jin<sup>3</sup>, CHEN Jin-ying<sup>3</sup>✉

(1. Hangzhou Branch of China National Grain and Cereals Storage and Quality Inspection Center (Jiangsu) Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310000, China; 2. Jinlin Branch of China Grain Storage and Quality Inspection Center Co., Ltd, Changchun, Jilin 130000, China; 3. Sinograin Chengdu Storage Research Institute Co., Ltd., Chengdu, Sichuan 610000, China)

**Abstract:** *Fusarium* infection of wheat can lead to scab, mycotoxin contamination and yield reduction. *Fusarium* is a serious threat to food security. In this study, the *Fusarium* strains in wheat were isolated and identified. The three strains N1, N2 and N3 belonged to *Fusarium graminearum*, *Fusarium asiaticum* and

收稿日期: 2023-08-29

基金项目: 2018-2020 年度中国科协青年人才托举工程项目 (2018QNRC001)

Supported by: 2018-2020 China Association for Science and Technology Young Talent Support Project (No.2018QNRC001)

作者简介: 和肖营, 女, 1990 年出生, 硕士, 工程师, 研究方向为粮油微生物及生物技术。E-mail: hexiaoying607@163.com

通讯作者: 陈晋莹, 男, 1987 年出生, 博士, 副研究员, 研究方向为粮油质量安全。E-mail: chen2331738@yeah.net

*Fusarium culmatum*, respectively. The production of zearalenone, vomitoxin and fumonisin by the three strains was analyzed by toxin-producing gene detection and mycotoxin detection. The results showed that N1 and N3 could produce zearalenone and vomitoxin, but did not produce fumonisin, while N2 did not produce these three toxins. In this study, ozone and chlorine dioxide were further used for gas fumigation to explore the effect of gas fumigation on the three strains isolated. By observing the spore morphology, mycelium length and mycelium morphology, the results showed that chlorine dioxide fumigation could effectively inhibit the growth of mycelium and spore germination, while ozone could only inhibit spore germination and had no obvious inhibitory effect on the growth of mycelium.

**Key words:** *Fusarium oxysporum*; virulence; mycotoxin; chlorine dioxide; ozone; fumigation

小麦是世界主要粮食作物，也是我国主要粮种之一，小麦生产的可持续性及其储藏的安全性，对保障国家粮食安全及社会稳定具有重要意义。小麦在种植期间极易遭到病虫害的侵染，其中最常见的是小麦赤霉病，小麦赤霉病是影响中国小麦可持续发展的关键因素。小麦赤霉病病害由禾谷镰孢菌复合种 (*Fusarium spp. complex*) 引起<sup>[1]</sup>。其中，禾谷镰孢菌属 (*Fusarium graminearum*) 种群是公认的引起小麦赤霉病的重要种属，该病菌发病率较高且侵袭性较强<sup>[1]</sup>，可导致小麦严重减产，可产生脱氧雪腐镰孢菌烯醇 (DON)、玉米赤霉烯酮 (ZEN)、雪腐镰孢菌烯醇 (Nivalenol, NIV) 等真菌毒素，污染小麦籽粒，威胁人类的健康<sup>[2]</sup>。尽管收获后一些物理除杂方法如鼓风机强风吹、筛分处理等，可除去部分赤霉病粒，但其病原菌仍然存在于小麦籽粒上，对后期储藏期间的粮食安全带来隐患。储藏过程中，有害微生物的活动是造成谷物品质下降和变质的主要原因。且在粮食加工、包装、销售和储存过程中，霉菌毒素会继续产生，在适宜的温湿度下可产生真菌毒素<sup>[3]</sup>。

大多数真菌毒素的化学性质和热稳定性都较强，食品加工过程中通常无法被破坏<sup>[4]</sup>。真菌毒素的降解方法一直是研究的热点问题。近年来，大量研究表明，二氧化氯 ( $\text{ClO}_2$ ) 和臭氧 ( $\text{O}_3$ ) 这两种强氧化性气体可以以气态或水态形式用于食品卫生消毒和食品储存中<sup>[5-6]</sup>。臭氧是一种强氧化剂，其本身的强氧化性可以改变微生物细胞膜的通透性，从而达到抑菌的效果。Diana De Santis 等研究了气态臭氧处理对大蒜贮藏过程中腐败真

菌的抑制作用，结果表明，臭氧处理不会影响大蒜储藏期间的气味，并且可以有效抑制大蒜在储藏期间的腐败现象<sup>[7]</sup>。 $\text{ClO}_2$  是一种应用广泛且安全高效的杀菌剂，具有强力的抗菌效力，在杀菌保鲜等领域有着广泛的研究基础，目前已被我国批准使用到瓜果蔬菜的保鲜中<sup>[8]</sup>。一些研究表明， $\text{ClO}_2$  对霉菌有一定的杀灭作用。马骏等以气体二氧化氯作为杀菌防霉剂，对接种于谷物上的黄曲霉进行研究，结果表明气体二氧化氯对黄曲霉的杀灭效果显著。8.5 mg/L 的气体二氧化氯作用于甜芥表面 30 min，杀菌率达到 98.4%；4.5 mg/L 的气体二氧化氯作用于苦芥表面 10 min，杀菌率达到 99.9%<sup>[9]</sup>。气体杀菌剂在瓜果蔬菜保鲜杀菌方面有广泛的研究基础，但鲜有文章研究气体杀菌剂对感染小麦赤霉病真菌的抑制作用。

本研究通过分离致使小麦感染赤霉病的镰孢菌菌株，并纯化筛选找到致使其发病的优势菌株，测定其产毒能力，并在实验室条件下模拟、验证其产毒能力，而后将臭氧和  $\text{ClO}_2$  作用于致病菌上，比较臭氧和  $\text{ClO}_2$  对致病菌株的抑制作用，为小麦赤霉病的防治提供一个新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的准备及优势菌株的分离鉴定

小麦样品采集自中国安徽，约 10 kg。采集的样品在运往实验室的途中被保存在无菌塑料袋中。按照 GB 1351—2008 《小麦》标准，从采集的小麦样品中选出感染赤霉病的麦粒，并将其分为粉红粒和白粒两种。分离后的样品用无菌水清洗，将洗涤液涂布于马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA)

培养基上,同时添加链霉素(25 mg/L)以防止杂菌污染。部分样品经无菌水清洗后直接接种于 PDA 上,剩余样品粉碎后用无菌水洗涤接种于 PDA 上,将接种后的培养基放置于 28 °C 的培养箱中培养 3~5 天。将分离出的单菌落转移到新的 PDA 平板上培养,直至获得单个纯菌落。

### 1.2 试剂与设备

0.1%无菌吐温 80:默克公司,澳大利亚。

粉碎机:KN 295 Knifetec、FossAnalytical;

高压灭菌锅:HIRAYAMA,日本;ClO<sub>2</sub> 气体发生器:WAERTE, China;臭氧发生器:DAHUAN, China;扫描电子显微镜:FEI, 美国。

### 1.3 病原真菌的鉴定

按照 Burgess 等<sup>[10]</sup>和 Nirenberg<sup>[11]</sup> 的方法进行形态学鉴定。利用 DNA 提取试剂盒(Vazyme Biotech Co., Ltd)对培养于 25 °C、7 天的真菌基因片段进行提取,ITS 区域的扩增选择真核生物通用扩增引物 ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; 翻译延长因子(EF-1 $\alpha$ )基因扩增引物为:EF1:5'-ATGGGTAAGGAAGACAAGAC-3'; EF2:5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3<sup>[12-13]</sup>。PCR 的扩增条件为 94 °C 10 min,55 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增采用 50  $\mu$ L 反应体系,刮取 100 ng 新鲜菌丝体作为 DNA 模板,加入 2 $\times$ mix 25  $\mu$ L,上下游引物各 10  $\mu$ M,剩余加入 ddH<sub>2</sub>O,配制成 50  $\mu$ L 的体系。1.5%琼脂糖凝胶在 120 v 20 min 条件下电泳检测 PCR 扩增产物<sup>[14]</sup>。将纯化后单克隆 PCR 产物交由生物公司进行测序。获得的核苷酸在 GenBank 数据库和镰刀菌属数据库,进行比对分析。最后利用 MEGA 5 建树分析,建立系统发育树<sup>[15]</sup>。

### 1.4 孢子制备

将活化后的镰刀菌株接种到羧甲基纤维素钠(CMC)液体孢子培养基,在 25 °C、180 rpm/min 的条件下培养 5 天。培养基用单层 Miracloth 过滤器过滤。然后将孢子悬浮液在 5 000 rpm 转速下离心 15 min,弃去上清液,洗涤时加入 0.1%无菌吐温 80。孢子悬浮液的初始浓度是通过测量血球计数器测定,调整孢子的最终浓度为 10<sup>6</sup> 孢子/毫升。

### 1.5 毒力基因的检测

对镰刀菌分离物进行分子鉴定后,对产生 DON (Tri5)、ZEN (PSK)和 FB (FUM1)的霉菌毒素的基因片段进行分析。所用引物如表 1 所示。PCR 系统与上述相同,反应程序为 94 °C 10 min,5 个循环 94 °C 40 s、52 °C 45 s、72 °C 1 min,进行 35 个循环:94 °C 40 s、55 °C 45 s 和 72 °C 1 min,最后在 72 °C 扩展 10 min。生成的 PCR 产物用 1.2%琼脂糖凝胶染色,并观察。

### 1.6 镰刀菌体外分离株产毒能力研究

选择颗粒饱满完整、无霉变和腐烂的 1 kg 玉米、小麦和糙米样品,加入无菌水将水分活度调节至 30%,密封于 4 °C 的冰箱中过夜。用粉碎机粉碎,混匀后,取 20 g 粉碎后的样品分装到 250 mL 锥形烧瓶中。每个样品制备三个重复样。用高压灭菌锅在 121 °C 下灭菌 20 min。每个锥形瓶中加入 5 mL 稀释的孢子悬浮液,再加入 5 mL 无菌水。对照组同样加入 5 mL 无菌水。样品在 25 °C、60% 相对湿度的黑暗环境中培养 7 天。每天对样品进行混匀处理,使真菌均匀分散到整个谷物样品中,并避免结块。谷物培养物在 50 °C 下烘干,并于 4 °C 下储存,直至进行真菌毒素分析。

表 1 用于检测致毒基因的引物

Table 1 Primers used to detect virulence genes

引物	序列(5'-3')	片段大小/bp	温度/°C	毒素类型	参考文献
Tri5-F	ACTTCCCACCGAGTATTTT	525	53	DON	[16]
Tri5-R	CAAAAACCTGTTGTTCCACTGCC				
PSK-F	AGATGGCCATGGTGCTTCGTGAT	480	55	ZEN	[17]
PSK-R	GTGGGCTTCGCTAGACCGTGAGTT				
Fum-F	GTCGAGTTGTTGACCACTGCG	846	58	FB	[18]
Fum-R	CGTATCGTCAGCATGATGTAGC				

## 1.7 霉菌毒素分析

采用胶体金技术快速定量测定伏马菌素含量<sup>[19]</sup>。脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定方法依照 GB 5009.111—2016《食品安全国家标准 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定》第二法进行，并稍作修改。将 50 mL dd H<sub>2</sub>O 加入装有 20 g 样品的锥形瓶中，在 4 °C 冰箱中浸泡过夜，第二天在 25 °C、200 rpm 转速下摇匀 30 min，过滤后备用。后续操作同上述国标法。玉米赤霉烯酮的提取方法是 GB 5009.209—2016《食品安全国家标准 食品中玉米赤霉烯酮的测定》中的第一法，并稍作修改。提取液为 50 mL、80% 的甲醇，加入装有 20 g 样品的锥形瓶中。在 4 °C 的冰箱中浸泡过夜，第二天在 25 °C、200 rpm/min 的条件下搅拌 30 min，过滤后备用。后续操作同上述国标法。

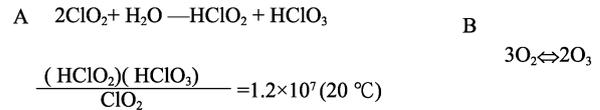
## 1.8 两种强氧化性气体熏蒸

将 20 μL 孢子悬浮液点在添加了链霉素的 PDA 培养基平板中央。然后，将接种有孢子的培养基直接用气体熏蒸剂处理，以研究其对孢子萌发的影响。为了研究抑制菌丝生长的情况，首先要将气体处理过的平板在 28 °C 下继续培养 24 h，菌丝长度每天测量一次，并记录结果。培养 2 d 后进行计数。

ClO<sub>2</sub> 的制备采用 ClO<sub>2</sub> 气体发生器，臭氧的制备利用臭氧发生器，具体制备过程见下图 1。

实验在一个改装过的装置中进行（图 2），分为对照组（无熏蒸）和处理组（有熏蒸剂）。用 ClO<sub>2</sub>（300 mg/L）或 O<sub>3</sub>（400 mg/L 或 1 400 mg/L）熏蒸。处理组分别暴露 30、60、90 和 120 min。气态熏蒸剂从进气口进入反应器底部，多余的空

气从玻璃反应器顶部排出<sup>[20-21]</sup>。为了安全起见，废气用饱和硫代硫酸钠水溶液中和<sup>[22-23]</sup>。



注：（A）气态 ClO<sub>2</sub> 是通过混合制造商说明中提到的溶液 A 和溶液 B 产生的。（B）臭氧气体是通过电离空气中的氧气产生的。

Note: (A) Gaseous ClO<sub>2</sub> is produced by mixing Solution A and Solution B as mentioned in the manufacturer's instructions. (B) Ozone gas is produced by ionizing oxygen in the air.

图 1 气态熏蒸剂生成原理

Fig.1 Principle of gaseous fumigant generation

## 1.9 镰刀菌的分析

刮取一小块用臭氧和二氧化氯熏蒸过的镰刀菌菌丝体，放入 1.5 mL 离心管中。用 500 μL 4% 多聚甲醛固定样品。离心收集沉淀，用磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）冲洗两次，每次 5 min。用 4% 蔗糖溶液洗涤一次，每次 5 min。用 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 酒精进行洗脱，每个梯度 10 min。加入 100% 酒精重新悬浮后，少量悬浮的液滴被吸收并加入玻璃中。将玻璃轻轻粘在导电胶上，在临界点处干燥，然后真空喷涂。最后，用扫描电子显微镜观察其形态变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 镰刀霉菌属的分离和鉴定

从观察到的实验结果来看，粉色赤霉病小麦中镰刀菌较多，白色赤霉病小麦中曲霉菌较多，总体菌落差异不明显。采用洗涤涂布法分离小麦表面的真菌，研磨法用于分离小麦内部的真菌如图 3。由基因测定结果可知，研磨法更适合分离镰刀菌。

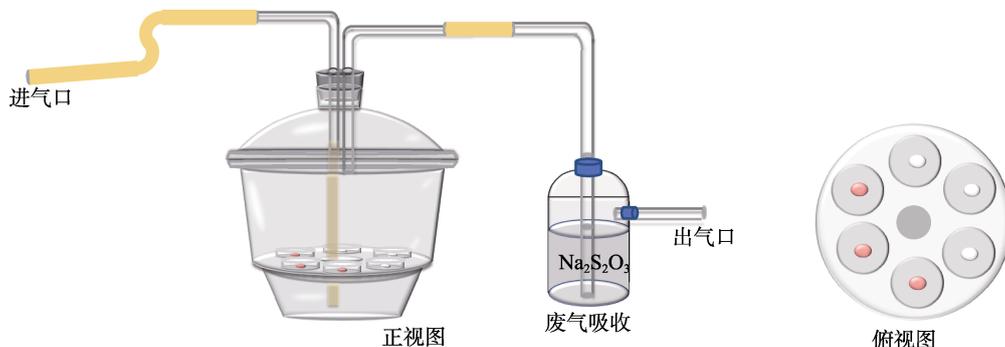
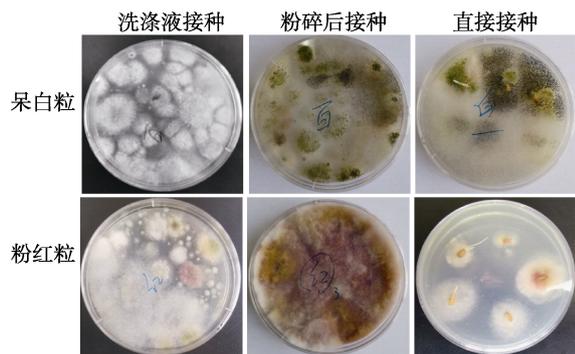


图 2 简单气体熏蒸处理系统示意图

Fig.2 Schematic diagram of simple gas fumigation treatment system



注：粉红色的赤霉病粒（FHB）种子中含有较多的镰刀菌，而白色的种子中含有较多的曲霉。

Note: Pink FHB seeds contained more *Fusarium* spp. while white seeds contained more *Aspergillus* spp.

图 3 镰刀菌属的分离

Fig.3 Isolation of *Fusarium* spp.

实验中分离出三种典型的镰刀菌株分别命名为 N1、N2 和 N3。为了进行系统进化分析，分别对 ITS 区序列和 EF1- $\alpha$  基因序列进行分析。扩增片段的大小符合预期。将扩增结果进行测序，并与基因库（NCBI，核酸数据库）和 MLST 数据库中的基因进行比对，结果显示与先前描述的镰刀菌属同源率为 95% 至 100%。根据 ITS 和 EF1- $\alpha$  基因序列构建系统发生树。结果表明，N1 与禾谷镰刀菌相同，N2 与亚洲镰刀菌相同，N3 与高秆镰刀菌相同。

### 2.2 体外致毒基因和致毒能力的检测

对与真菌毒素生物合成有关的基因进行了 PCR 检测。基因结果表明，菌株 N2 不含三种产

毒基因，而 N1 和 N3 均含有蛋白丝氨酸激酶（PSK）和 Tri5 两种产毒基因，表明这些分离物，在适当条件下可能产生 ZEN 和 DON。霉菌毒素的本底含量如表 2 所示。以三种天然谷物为培养基，培养的三种菌株产生的真菌毒素如表 3 所示。其中，N1 和 N3 能在体外产生 ZEN 和 DON，但不产生伏马毒素（FBs），而 N2 菌株不产生这三种毒素中的任何一种。这与分子生物学鉴定出的产毒基因片段一致。此外，两株菌株在三种不同的天然培养基上产生的霉菌毒素含量不同。

### 2.3 气体熏蒸剂对镰刀菌菌株的影响

在 PDA 上利用气态熏蒸剂分析对所分离镰刀菌菌株的影响，结果显示真菌孢子的萌发在熏蒸气体处理 30 min 后被完全抑制。从图 4 的显微镜下可以观察到熏蒸过的分生孢子细胞由透明变为浑浊，外衣结构被破坏，孢子失去活性。

表 2 谷物培养基中真菌毒素的本底含量

Table 2 Background content of mycotoxins in cereal media  $\mu\text{g}/\text{kg}$

培养基类型	真菌毒素 ( $\pm\text{SD}$ ) <sup>a</sup>		
	DON	FBs	ZEN
小麦	136.37 $\pm$ 8.70	951.71 $\pm$ 38.30	ND
玉米	234.21 $\pm$ 10.20	1 642.71 $\pm$ 50.40	ND
稻谷	ND	787.67 $\pm$ 28.50	ND

注：a 三个重复的平均值；ND，未检测到（低于检测限）。

Note: a Average of three replicates; ND, not detected (below detection limit).

表 3 谷物培养基中分离出的镰刀菌的产毒能力

Table 3 Toigenic capacity of *Fusarium* isolated in cereal media  $\mu\text{g}/\text{kg}$

分离出	培养基类型	真菌毒素 ( $\pm\text{SD}$ ) <sup>a</sup>		
		DON	FBs	ZEN
控制组	小麦	112.29 $\pm$ 7.2	925.37 $\pm$ 29.6	ND
	玉米	198.34 $\pm$ 8.9	1 429.52 $\pm$ 46.3	ND
	稻谷	ND	736.21 $\pm$ 22.9	ND
N1	小麦	5 520.6 $\pm$ 258.4	930.25 $\pm$ 27.3	41 148.0 $\pm$ 499.2
	玉米	33 309.6 $\pm$ 492.5	1 572.41 $\pm$ 43.7	34 103.2 $\pm$ 372.1
	稻谷	16 808.4 $\pm$ 312.6	802.37 $\pm$ 25.2	38 572.1 $\pm$ 403.7
N2	小麦	143.1 $\pm$ 8.5	961.37 $\pm$ 28.2	ND
	玉米	212.42 $\pm$ 9.1	1 433.61 $\pm$ 44.6	ND
	稻谷	ND	745.70 $\pm$ 32.1	ND
N3	小麦	47 125.0 $\pm$ 529.1	922.11 $\pm$ 25.4	12 458.2 $\pm$ 294.6
	玉米	7 796.7 $\pm$ 297.3	1 407.24 $\pm$ 43.1	9 663.1 $\pm$ 287.3
	稻谷	11 379.0 $\pm$ 302.2	792.41 $\pm$ 24.7	4 872.7 $\pm$ 215.9

注：a 三个重复的平均值；ND，未检测到（低于检测限）。

Note: a Average of three replicates; ND, not detected (below detection limit).

### 2.4 抑制镰刀菌菌丝生长

在无菌条件下, 将在 28 °C 下培养 36 h 的平皿放入反应器中, 并进行熏蒸。实验开始后, 每天在同一时间测量菌丝长度。实验结果表明, O<sub>3</sub>

对菌丝的抑制作用很小(图 5), 即使在 1 400 mg/L 的浓度下熏蒸 2 h (数据未显示), 也没有特别明显的抑制作用。从扫描电子显微镜的结果也得出了同样的结论, 熏蒸后的菌丝体表面与对照组一

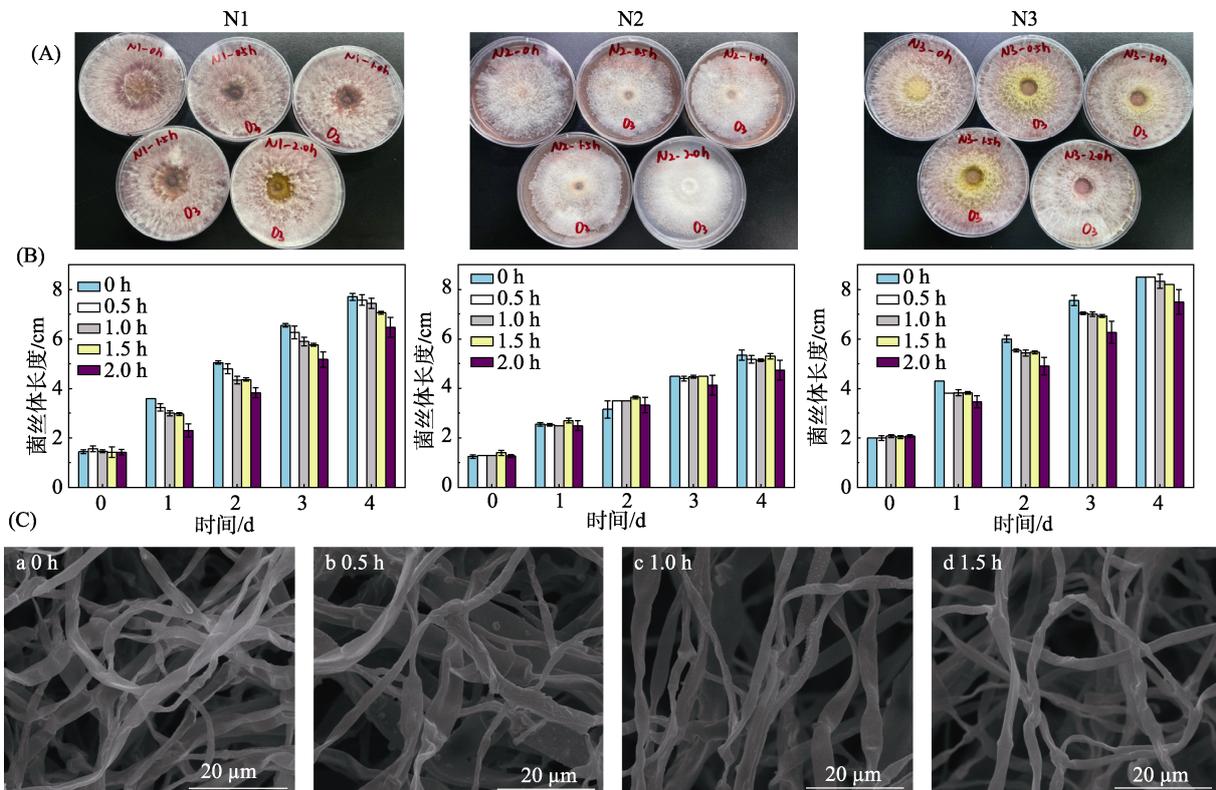


注: (A) 显微镜下观察 N1 菌株的孢子形态, 呈镰刀状, 表面光滑, 细胞透明, 有明显的横隔膜。用 O<sub>3</sub> (B) 和 ClO<sub>2</sub> (C) 处理 30 分钟后观察孢子形态。表面凹凸不平, 细胞浑浊, 胞内隔膜消失。

Note: (A) Microscopic observation of the spore morphology of strain N1, which was sickle-shaped with a smooth surface, hyaline cells and a distinct septum. The spore morphology was observed after treatment with O<sub>3</sub> (B) and ClO<sub>2</sub> (C) for 30 min. The surface was uneven, the cells were turbid, and the intracellular septum disappeared.

图 4 抑制孢子萌发

Fig.4 Inhibition of spore germination



注: (A) O<sub>3</sub> 熏蒸后平板培养 4 天的菌丝生长结果; (B) 培养过程中菌丝长度的测量结果; (C) O<sub>3</sub> 处理不同时间后 N1 菌丝的扫描电镜观察。

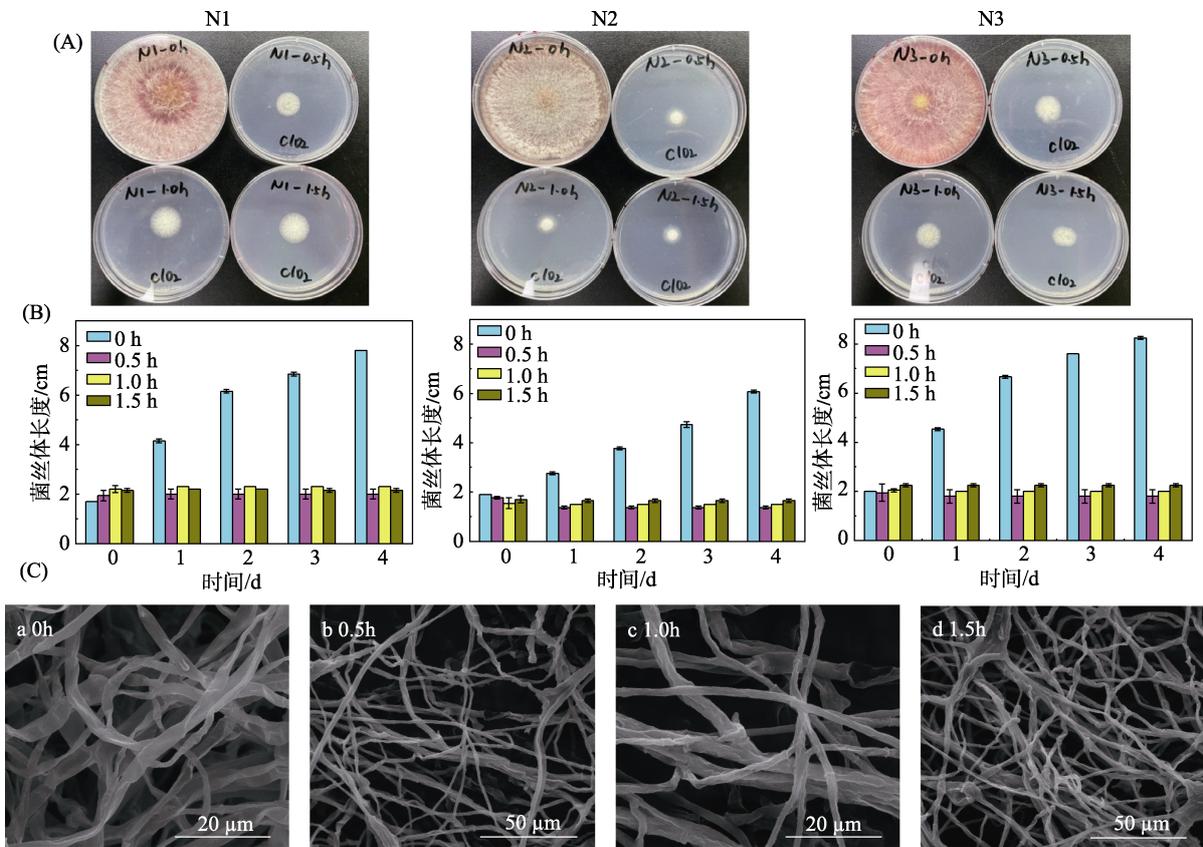
Note: (A) Mycelial growth of plates incubated for 4 days after O<sub>3</sub> fumigation; (B) Measurement of mycelium length during incubation; (C) Scanning electron microscope observation of N1 mycelium after different times of O<sub>3</sub> treatment.

图 5 O<sub>3</sub> 对菌丝生长的影响

Fig.5 Effect of O<sub>3</sub> on mycelial growth

样光滑。而  $\text{ClO}_2$  对菌丝生长的影响与  $\text{O}_3$  不同， $\text{ClO}_2$  熏蒸 0.5 h 后，菌丝在接下来的四天中不再继续生长。扫描电镜也显示同样的结果，菌丝表

面变得粗糙和萎缩，菌丝出现老化或死亡(图 6)。从以上结果可知，二氧化氯对镰刀菌的菌丝生长有明显的抑制作用。



注：(A)  $\text{ClO}_2$  熏蒸后平板培养 4 天的菌丝生长结果；(B) 培养过程中菌丝长度的测量结果；(C)  $\text{ClO}_2$  处理不同时间后 N1 菌丝的扫描电镜观察。

Note: (A) Mycelial growth of plates incubated for 4 days after  $\text{ClO}_2$  fumigation; (B) Measurement of mycelium length during incubation; (C) Scanning electron microscope observation of N1 mycelium after different times of  $\text{ClO}_2$  treatment.

图 6  $\text{ClO}_2$  对菌丝生长的影响

Fig.6 Effect of  $\text{ClO}_2$  on mycelial growth

### 3 讨论与结论

在本研究中，从感染小麦赤霉病的颗粒中分离出了 3 个典型的镰刀菌株，分别命名为 N1、N2 和 N3。利用内部转录间隔 (ITS) 基因和延伸因子 1- $\alpha$  基因 (EF1- $\alpha$ ) 进行系统发育分析，确定三种菌株分别为禾谷镰刀菌属 (*Fusarium graminearum*)、亚洲镰刀菌属 (*Fusarium asiaticum*) 和高秆镰刀菌属 (*Fusarium culmorum*)。此外，检测了分离菌株的致毒基因及其体外致毒能力。利用胶体金技术的快速定量法检测 FBs 和基于免疫亲和层析的方法检测 DON 和 ZEN，结果发现产毒菌株均含有产毒基因。最后，检测了  $\text{ClO}_2$  和  $\text{O}_3$  在体外不同暴露时间下对镰刀菌生长的控制效果。商用

气体发生器产生的臭氧和二氧化氯都能在短时间内杀死真菌孢子，经熏蒸处理的孢子即使在连续培养 7 天后也不会增殖。平板培养结果与显微镜结果一致。但它们对镰刀菌菌丝生长的抑制作用却不同。低浓度二氧化氯 (300 mg/L) 处理 0.5 h，可明显抑制菌丝的生长，即使再培养也不再生长。但即便是高浓度臭氧 (1 400 mg/L) 处理 2 h 对菌丝生长亦无明显抑制作用。菌丝的生长数据与扫描电镜结果一致。本研究与史健阳等的研究结果一致，史健阳等利用气态  $\text{ClO}_2$  研究其对黄曲霉菌丝生长、孢子萌发，以及黄曲霉菌产毒能力的抑制作用，结果表明  $\text{ClO}_2$  对黄曲霉菌丝生长、产毒能力、孢子萌发都有强烈抑制作用，对抑制高水

分玉米中黄曲霉菌孢子萌发也有显著效果<sup>[24]</sup>。杨莎等也对气态  $\text{ClO}_2$  对黄曲霉的抑制作用进行过研究, 结果表明气体二氧化氯对黄曲霉的抑菌效果显著, 最佳抑菌条件为: 当霉菌载体为苦荞时, 气体二氧化氯浓度为 4.5 mg/L, 抑菌时间为 40 min, 抑菌率可达 99.99%<sup>[25]</sup>。

气态  $\text{ClO}_2$  还被广泛用于控制新鲜果蔬的食源性或收获后微生物污染<sup>[26]</sup>。 $\text{ClO}_2$  熏蒸可有效杀灭对磷化氢敏感和抗性的贮藏产品昆虫种类, 而且不会对储存的稻米造成严重的化学残留<sup>[27]</sup>。Yu 等指出  $\text{AFB}_1$  可被气态  $\text{ClO}_2$  成功分解为对人体无毒的物质。这对将  $\text{ClO}_2$  应用于霉菌毒素降解中具有重要的指导意义<sup>[28]</sup>。

综上所述, 本研究的结果表明, 与霉菌毒素生物合成有关的基因, 可用于快速预测真菌的毒性。镰刀菌属是小麦中的主要污染物,  $\text{ClO}_2$  气体在低浓度下能有效控制镰刀菌属的生长。因此, 气态  $\text{ClO}_2$  可作为一种潜在的绿色熏蒸剂, 用于控制霉菌, 并将该技术应用于谷物储藏期间的真菌毒素降解。

### 参考文献:

- [1] BECCARI G, ARELLANO C, COVARELLI L, et al. Effect of wheat infection timing on Fusarium head blight causal agents and secondary metabolites in grain[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 290: 214-225.
- [2] 伏进, 韩佳东, 朱祥林. 小麦赤霉病秆腐症状形成的主要途径[J]. *大麦与谷类科学*, 2022(2):39.  
FU J, HAN J D, ZHU X L. The main way of stem rot symptom development of wheat scab[J]. *Barley and Cereal Sciences*, 2022(2): 39.
- [3] ORTEGA L M, ROMERO L, MOURE C, et al. Effect of moisture on wheat grains lipid patterns and infection with Fusarium graminearum[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 306: 108264.
- [4] MURSHED S A A, RIZWAN M, AKBAR, et al. Analysis of the Aflatoxin M1 contamination in traditional and commercial cheeses consumed in Yemen[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2022, 75(1): 194-200.
- [5] CAO L, GUO X, LIN C, et al. Inhibitory effect on spoilage molds from freshly peeled garlic of ozone treatment[J]. *Food Science and Technology*, 7: 4.
- [6] CAO S, MENG L, MA C, et al. Effect of ozone treatment on physicochemical parameters and ethylene biosynthesis inhibition in Guichang kiwifruit[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 42: 64820.
- [7] SANTIS D, GARZOLI S, VETTRAINO A M. Effect of gaseous ozone treatment on the aroma and clove rot by Fusarium proliferatum during garlic postharvest storage[J]. *Heliyon*, 2021, 7(4): e06634.
- [8] YANG H, ZHENG J, HUANG C, et al. Effects of combined aqueous chlorine dioxide and chitosan coatings on microbial growth and quality maintenance of fresh-cut bamboo shoots (*Phyllostachys praecox* f. *prevernalis*.) during storage[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2015, 8(5): 1011-1019.
- [9] 马骏, 晋日亚, 郑璐, 等. 气体二氧化氯对谷物表面黄曲霉杀灭效果研究[J]. *粮食与油脂*, 2015, 28(6): 3.  
MA J, JIN R Y, ZHENG L, et al. Study on the sterilization of chlorine dioxide gas on *Aspergillus flavus* which seeded in grain[J]. *Cereals & Oils*, 2015, 28(6): 3.
- [10] BURGESS L W, SUMMERELL B A, BULLOCK S, et al. Laboratory manual for Fusarium research (3rd ed.)[J]. Sydney: University of Sydney, 1994.
- [11] LESLIE J F, SUMMERELL B A. The Fusarium laboratory manual[J]. Ames: Blackwell, 2006.
- [12] O'DONNELL K, KISTLER H C, CIGELNIK E, et al. Multiple evolutionary origins of the Fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(5): 2044-2049.
- [13] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications[J]. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [14] SANG M K, KIM H S, MYUNG I S, et al. *Chryseobacterium kwangjuense* sp. nov., isolated from pepper (*Capsicum annuum* L.) root[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(8): 2835-2840.
- [15] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [16] NIESSEN L, SCHMIDT H, VOGEL R F. The use of tri5 gene sequences for PCR detection and taxonomy of tricothecene-producing species in the Fusarium section Sporotrichiella[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 95(3): 305-319.
- [17] LYSØE E, KLEMSDAL S S, BONE K R, et al. The PKS4 gene of fusarium graminearum is essential for zearalenone production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 3924-3932.
- [18] RICHARD B, HAMED A, GARY W, et al. Identification of select fumonisin forming fusarium species using PCR applications of the polyketide synthase gene and its relationship

- to fumonisin production in vitro[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(4): 554-570.
- [19] LING S, WANG R, GU X, et al. Rapid detection of fumonisin B1 using a colloidal gold immunoassay strip test in corn samples[J]. Toxicon, 2015, 108: 210-215.
- [20] SAVI G D, PIACENTINI K C, BITTENCOURT, et al. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination[J]. Journal of Stored Products Research, 2014, 59: 245-253.
- [21] SUN C, ZHU P, JI J, et al. X. Role of aqueous chlorine dioxide in controlling the growth of *Fusarium graminearum* and its application on contaminated wheat[J]. LWT, 2017, 84: 555-561.
- [22] JONES A C, GENSEME R R W, STUBBLEFIELD W A, et al. Toxicity of ozonated seawater to marine organisms[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006, 25(10): 2683-2691.
- [23] MA J W, HUANG B S, HSU, et al. Efficacy and safety evaluation of a chlorine dioxide solution[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2017, 14(3): 329.
- [24] 史健阳, 宁华, 徐冉, 等. 二氧化氯抑制黄曲霉菌生长和产毒能力及其在高水分玉米中的应用[J]. 中国测试, 2017, 43(10): 47-52.
- SHI J Y, NING H, XU R, et al. Inhibitory effect on the growth and aflatoxin-production of *Aspergillus flavus* by  $\text{ClO}_2$  and its application in corn of high water content[J]. China Measurement & Test, 2017, 43(10): 47-52.
- [25] 杨莎, 白小龙, 晋日亚, 等. 气体二氧化氯对黄曲霉的抑菌效果研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(15): 4.
- YANG S, BAI X L, JIN R Y, et al. Study on the sterilization of chlorine dioxide gas on *Aspergillus flavus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(15): 4.
- [26] BHAFAT A, MAHMOUD B S M, LINTON R H, et al. Effect of chlorine dioxide gas on salmonella enterica inoculated on navel orange surfaces and its impact on the quality attributes of treated oranges[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(1): 77-85.
- [27] E X, LI B, SURBRAMANYAM B. Toxicity of chlorine dioxide gas to phosphine-susceptible and -resistant adults of five stored product insect species: influence of temperature and food during gas exposure[J]. Journal of Economic Entomology, 2018, 111(4): 1947-1957.
- [28] YU Y, SHI J, XIE B, et al. Detoxification of aflatoxin B1 in corn by chlorine dioxide gas[J]. Food Chemistry, 2020, 328: 127121. 

备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。