

串珠镰刀菌分离菌株 PCR 筛选鉴定方法的研究

王晓英 刘秀梅

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:为监测粮食中的串珠镰刀菌污染,根据 rDNA18S、5.8S、28S 及其间区 ITS 和 ITS2 序列,设计了 1 对镰刀菌属特异性引物 Fu3/Fu4 及 2 对串珠镰刀菌种特异性引物 Fu5/Fu4(Ⅰ型 ITS2 特异性)和 Fu3/Fu2(Ⅱ型 ITS2 特异性),建立了串珠镰刀菌 PCR 及复合 PCR 检测方法。Fu3/Fu4、Fu3/Fu2 和 Fu5/Fu4 分别扩增 516 bp、375 bp 和 188 bp 的 DNA 片段。Fu3/Fu4 PCR 的检出灵敏度为 10 pg, Fu5/Fu4 为 100 pg,复合 PCR(Fu3、Fu5 和 Fu4)的检出限为 100 pg,分别相当于每次反应检出 10^3 、 10^4 和 10^4 个孢子。复合 PCR 可以同时鉴别镰刀菌属和串珠镰刀菌种。检测了 32 株从山东、浙江、安徽和河南 4 省区分离的串珠镰刀菌及交孢镰刀菌,26 株为 Ⅰ型 ITS2 特异性,4 株为 Ⅱ型 ITS2 特异性,两株待定。该方法可用于大量快速筛选串珠镰刀菌,有利于进一步开展串珠镰刀菌在我国的生态分布、生物地域学及系统发育学等方面的研究。该方法快速、敏感、特异,适宜粮食中串珠镰刀菌污染的监测。

关键词:镰刀菌属;序列分析;DNA;聚合酶链反应;食品

PCR technique for rapid screening of *Fusarium verticillioides*

WANG Xiao-ying, LIU Xiu-mei

(National Institute for Nutrition and Food safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: A pair of genus-specific primer Fu3/F4 for *Fusarium* and two pairs of species-specific primer Fu5/4 (type I specific) and Fu3/2 (type II specific) for *Fusarium verticillioides* were designed, based on 18S, 5.8S, 28S rDNA and internal transcribed spacer ITS2 sequence. Rapid, sensitive and specific PCR and multiple-primer PCR for detecting *Fusarium verticillioides* strains were developed. 516 bp、375 bp 和 188 bp DNA fragments were produced by Fu3/Fu4, Fu3/Fu2 and Fu5/Fu4, respectively. The detection sensitivity of PCR with Fu3/Fu4 and Fu5/Fu4 were 10 pg and 100 pg DNA, equivalently 10^3 and 10^4 spores per PCR assay, respectively. The detection limits of multiple-primer PCR with Fu3, Fu5 and Fu4, which can be used for identifying both *Fusarium* and *Fusarium verticillioides*, was 100 pg, equivalently 10^4 spores per PCR assay. A total of 32 strains of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium subglutinans* isolated from Shandong, Zhejiang, Anhui and Henan Provinces were determined. 26 out of them were ITS2 type I specific and 4 strains ITS2 type II specific. Other 2 strains are to be studied further.

Key Words: *Fusarium*; Sequence Analysis; DNA; Polymerase Chain Reaction; Food

串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme* Sheldon 或 *Fusarium verticillioides*) 的有性阶段为水稻枯萎病赤霉 (*Gibberella fujikuroi*), 为非宿主特异性^[1]。主要污染高粱、小麦、棉花、豆类、西红柿、花生、香蕉、大豆、青椒及一些饲料,而玉米串珠镰刀菌的污染率几乎占 90%^[2],引起秧苗枯萎、根茎穗及种子腐烂,造成严重的农业经济损失^[3]。我国串珠镰刀菌的地区分

布广泛,严重污染玉米^[4]。另外,串珠镰刀菌通常存在于看似健康的玉米组织中,产生多种毒性代谢产物,如伏马菌素 (Fumonisin)、串珠镰刀菌素 (Moniliformine)、镰刀菌素 C (Fusarin C) 和镰刀菌酸 (Fusaric Acid) 等,对人及动物有很强的毒性。其中伏马菌素可引起动物各种疾病,如马脑白质软化症、猪肺水肿或大鼠肝癌,伏马菌素也被认为与人类食

基金项目:国家自然科学基金项目(39870675)

作者简介:王晓英 女 博士

通讯作者:刘秀梅 女 首席科学家

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China. (39870675)

管癌的高发有关^[5]。严重威胁食品安全及人类和动物的健康。

国外应用以 rDNA 为基础的 PCR 技术及产物测序,特异性分析引起人类感染的镰刀菌^[6,7],不能区别串珠镰刀菌。O'Donnell 等^[8,9] 根据镰刀菌的 rDNA 及其间区 ITS 序列 (Internal Transcribed Spacer, ITS),研究其起源及系统发育,证实该群菌株都有 2 个高度可变的 ITS2 序列,被命名为 I 型和 II 型,它们是在放射状演化之前,由非直向同源的种间杂交(异源进化起源)或基因复制(平行进化起源)而形成的,为镰刀菌属基因树的绘制及生物地理起源假说提供了科学的理论依据。

本研究的目的是建立一种经济、快速、简便且准确的串珠镰刀菌的检测方法,为监测我国主粮样品中串珠镰刀菌的污染,探讨其在我国不同地域的分布及流行趋势,提供可靠的技术手段。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 3 株典型串珠镰刀菌 (ATCC 52539、ATCC 38946 和 ATCC 26263)、2 株与串珠镰刀菌亲缘关系非常近的参考菌株 ATCC 12763 (*Fusarium nygamai*) 和 ATCC 38016 (胶孢镰刀菌) 均由美国菌种保藏中心 (ATCC) 提供; 32 株分离菌株分别来源于山东、浙江、安徽和河南 4 省, 7 株其它镰刀菌、曲霉菌、青霉菌等阴性对照菌株购于中国科学院微生物学研究所 (表 1)。

培养基和试剂

沙保琼脂斜面 10 g 蛋白胨、10 g 葡萄糖和 15 g 琼脂,加蒸馏水至 1 000 ml,加热溶化,分装中试管,每管 5~10 ml,121 高压灭菌 20 min,制成斜面。

改良 LB 培养基 1% 蛋白胨、0.5% 酵母粉、1% NaCl、2% 蔗糖, pH 6.0。

100-bp DNA Ladder (Promega 公司)、100 mmol/L dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega 公司)、超纯琼脂糖 (Gibco 公司)。Taq PCR polymerase Kit (QIAGEN, Couraboeuf, 法国) 5 U/μl。10% [质量/体积分数] Chelex-100 (Sigma 公司) 溶液: 由 0.1% [质量/体积分数] SDS、1% [体积分数] Nonidet P-40、1% [体积分数] tween-80 配制。

紫外分光光度计 (Waters 公司)、PCR 扩增仪 (Biometra^R Personal Cycler, 德国)、自动凝胶成像系统 UVP (white/ultraviolet Transluminator, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 所有菌株常规生长于沙保琼脂

表 1 实验用菌株

菌株来源	名称	菌号
国际典型参考菌株	<i>Fusarium verticillioides</i>	ATCC 52539
	<i>Fusarium verticillioides</i>	ATCC 38946
	<i>Fusarium verticillioides</i>	ATCC 26263
我国分离菌株	<i>F. nygamai</i>	ATCC 12763
	<i>F. subglutinans</i>	ATCC 38016
	<i>Fusarium verticillioides</i>	SD-fm031
	<i>Fusarium verticillioides</i>	SD-fm032
	<i>Fusarium verticillioides</i>	SD-fm033
	<i>Fusarium verticillioides</i>	SD-fm034
	<i>Fusarium verticillioides</i>	SD-fm035
	<i>Fusarium verticillioides</i>	SD-fm036
	<i>Fusarium verticillioides</i>	SD-fm037
	<i>Fusarium verticillioides</i>	SD-fm038
	<i>Fusarium verticillioides</i>	SD-fm039
	<i>Fusarium verticillioides</i>	SD-fm040
	<i>Fusarium verticillioides</i>	SD-fm043
	<i>Fusarium verticillioides</i>	Z-fm041
	<i>Fusarium verticillioides</i>	Z-fm044
	<i>Fusarium verticillioides</i>	Z-fm048
	<i>Fusarium verticillioides</i>	Z-fm049
	<i>Fusarium verticillioides</i>	Z-fm052
	<i>Fusarium verticillioides</i>	Z-fm064
	<i>Fusarium verticillioides</i>	Z-fm065
<i>Fusarium verticillioides</i>	Z-fm066	
<i>Fusarium verticillioides</i>	AH-fm001	
<i>Fusarium verticillioides</i>	AH-fm002	
<i>Fusarium verticillioides</i>	AH-fm003	
<i>Fusarium verticillioides</i>	HN-fm001	
<i>Fusarium verticillioides</i>	HN-fm006	
<i>Fusarium verticillioides</i>	HN-fm15	
<i>Fusarium verticillioides</i>	HN-fm16	
<i>Fusarium verticillioides</i>	HN-fm18	
<i>F. subglutinans</i>	SD-fmv041	
<i>F. subglutinans</i>	SD-fmv047	
<i>F. subglutinans</i>	SD-fmv049	
其它对照菌株	<i>F. graminearum</i>	3.4521
	<i>F. poae</i>	3.4601
	<i>F. equiseti</i>	3.4597
	<i>F. tricinctum</i>	3.4731
	<i>A. flavus</i>	10124
	<i>P. Bainier</i>	
	<i>E. coli</i>	L113

注: 1. “SD、Z、AH 和 HN”代表山东、浙江、安徽和河南; 2. “fm”: *Fusarium verticillioides*; 3. “fmv”: *Fusarium subglutinans*。

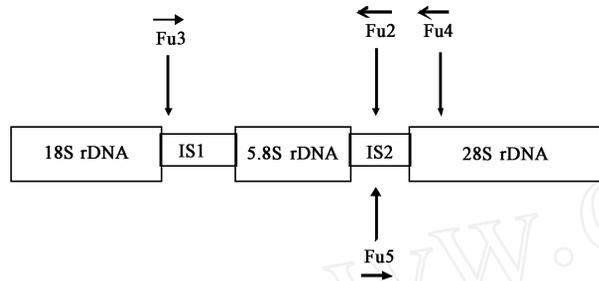
斜面,于 28 培养,置 4 保存。

1.2.2 DNA 的提取 采用改良 Chelex 提取法^[11]。用接种针于沙保琼脂斜面挑取少量培养物,接种于 2 ml 无菌改良 LB 培养基,置 28 振荡培养 24 h,取 1 ml 于 1.5 ml 离心管,1 000 r/min 离心 10 min,用 1 ml 无菌蒸馏水洗 1 次,弃上清液,加蒸馏水使终体积为 300 μl,再加入 100 μl 10% Chelex 溶液混合均匀,置 95 作用 30 min,然后冰浴 5 min。10 000 g 离心 5 min,收集上清液,取 1 μl 作为 PCR 扩增模板 DNA。

1.2.3 PCR 引物的设计 以真菌 18S、5.8S、28S rDNA 及其间区 ITS1 和 ITS2 序列为基础,应用 DNAMAN 软件 (DNAMAN version 5.0 Demo, Lynnon BioSoft),检索基因数据库,比较数据库中存在的镰

刀菌属中 51 个种共计 193 株菌的 rDNA 及其间区核苷酸序列,根据引物设计原则,设计出串珠镰刀菌 ITS2 序列 I 型特异性引物 Fu5、II 型特异性引物 Fu2 及镰刀菌属特异的引物对 Fu3/Fu4^[9]。

1.2.4 PCR 扩增 PCR 反应体积 (50 μ l): 5 μ l Taq polymerase 缓冲液, 1 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 0.2 μ l Taq DNA polymerase, 1 μ l 10 mmol/L dNTPs, 1 μ l 10 mmol/L 引物对, 1 μ l 模板 DNA 和 40.8 μ l 无菌 ddH₂O, 设无 DNA 的阴性对照。PCR 扩增条件: 94 变性 5 min, 接着 33 个循环: 变性 94 30 s, 复性 55 30 s, 延伸 72 1 min, 最终延伸 72 10 min。



Fu3、Fu4 为镰刀菌属特异性引物;
Fu2、Fu5 为串珠镰刀菌特异性引物。

图 1 镰刀菌属和串珠镰刀菌种特异引物的设计

引物在 rDNA 中的定位见图 1, 序列见表 2。引物对 Fu3/Fu4、Fu3/Fu2 和 Fu5/Fu4 分别产生 516 bp、375 bp 和 188 bp 的片段。

表 2 镰刀菌属和串珠镰刀菌种 (I 型和 II 型) PCR 引物的核苷酸序列

引物	方向	特异性	引物序列
Fu2	反向	ITS2 II 型	5' > TAG ATT TCG GGG CCG GCT T < 3'
Fu3	顺向	镰刀菌属	5' > CCG AGT TTA CAA CTC CCA AA < 3'
Fu4	反向	镰刀菌属	5' > TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC < 3'
Fu5	顺向	ITS2 I 型	5' > TTG GGA CTC GCG AGT CAA ATC < 3'

1.2.5 复合 PCR 在反应体系中,同时加入 10 mmol/L 镰刀菌属特异的引物对 (Fu3/Fu4) 和串珠镰刀菌种特异的引物对 (Fu5/Fu4) 各 1 μ l, 使引物 Fu3、Fu5 和 Fu4 最终浓度分别为 0.2、0.2 和 0.4 mmol/L, 用 ddH₂O 调整反应总体积为 50 μ l, 其它条件与反应参数同以上 PCR。

1.2.6 反应的敏感性 为测定引物对 Fu3/Fu4 和 Fu5/Fu4 PCR 方法 (PCR 和复合 PCR) 的敏感性, 应用紫外分光光度计测定 ATCC 52539 A₂₆₀ 值, 计算 DNA 含量。并以无菌水稀释 ATCC 52539 总 DNA 至终浓度 1 ng/ μ l、100 pg/ μ l、10 pg/ μ l、1 pg/ μ l、500 fg/ μ l、250 fg/ μ l、100 fg/ μ l、50 fg/ μ l 和 10 fg/ μ l, 进行 PCR 扩增, 设无菌水为阴性对照。同时以琼脂板计数法测定 ATCC 52539 DNA 量所对应的孢子数。

1.2.7 琼脂糖凝胶电泳 1.2% 琼脂糖凝胶, 每孔载样 10 μ l, 同时以 100-bp DNA Ladder 作为分子量对

照, 75 V (5 V/cm) 电泳 2 h, EB 染色 (0.5 μ g/ml), 在波长为 258 nm 的紫外光下, 用自动凝胶成像系统观察、扫描并储存电泳结果。

2 结果

2.1 PCR 反应特异性

以黄曲霉、拟青霉及大肠杆菌为阴性对照, 检测 3 株典型串珠镰刀菌 (ATCC 52539、ATCC 38946 和 ATCC 26263)、2 株与串珠镰刀菌亲缘关系非常近的参考菌株 *Fusarium nygamai* (ATCC 12763) 和胶孢镰刀菌 (ATCC 38016)、禾谷镰刀菌、三线镰刀菌各 1 株和 5 株串珠镰刀菌国内分离株, 并设不含 DNA 的水为阴性对照。各对引物扩增结果见表 3。Fu3/Fu4 扩增所有镰刀菌菌株, 产生 516 bp 的 DNA 片段, 黄曲霉、拟青霉及大肠杆菌为阴性。Fu5/Fu4 只扩增串珠镰刀菌和胶孢镰刀菌, 获得 188 bp 的 DNA 片段, 结果阳性, ATCC 12763 及其它阴性对照菌株无片段产生, 扩增结果阴性。结果说明 Fu3/Fu4 和 Fu5/Fu4 具有很好的镰刀菌属和串珠镰刀菌种特异性, 并且所有菌株的 Fu3/Fu2 扩增结果均为阴性 (图 2)。说明这些菌株的 ITS2 序列为 I 型, 非 II 型 (ATCC 12763 除外)。测序 Fu3/Fu4 扩增产物, 应用 DNAMAN, 将基因库中发表的镰刀菌及串珠镰刀菌序列进行比较, 与预期结果一致, 确证了引物的特异性 (未发表)。

表 3 串珠镰刀菌及胶孢镰刀菌 PCR 反应的特异性

菌株	PCR 结果		
	Fu3/Fu4	Fu5/Fu4 (I)	Fu3/Fu2 (II)
ATCC 52539	+	+	-
ATCC 38946	+	+	-
ATCC 26263	+	+	-
ATCC 38016	+	+	-
ATCC 12763	+	-	-
SD-fm031	+	+	-
SD-fm033	+	+	-
SD-fm039	+	+	-
Z-fm049	+	+	-
Z-fm052	+	+	-
<i>F. graminearum</i>	+	-	-
<i>F. tricinctum</i>	+	-	-
<i>A. flavus</i>	-	-	-
<i>P. Bainier</i>	-	-	-
<i>E. coli</i> L113	-	-	-

注: “+”为结果阳性, “-”为结果阴性

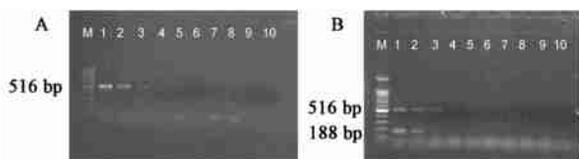
2.2 PCR 敏感性

以无菌水稀释 ATCC 52539 染色体 DNA, 测得 Fu3/Fu4 每个 PCR 反应的检出限为 10 pg, Fu5/Fu4 为 100 pg, 复合 PCR (Fu3、Fu5 和 Fu4) 为 100 pg, 未加 DNA 的水对照结果阴性 (图 3)。根据不同孢子数所对应的 DNA 量, 推算出 Fu3/Fu4 和 Fu5/Fu4 每个 PCR 反应理论检出限分别为 10³ 和 10⁴ 个孢子。



M. 为 100 bp DNA 标准品;1~15 分别为 SD-fm031、033、039; Z-fm049、052; ATCC12763、52539、26263、38946、38016; 黄曲霉; 禾谷镰刀菌、三线镰刀菌、L113、H₂O。

图 2 PCR 反应特异性(A: Fu3/Fu4; B: Fu5/Fu4)

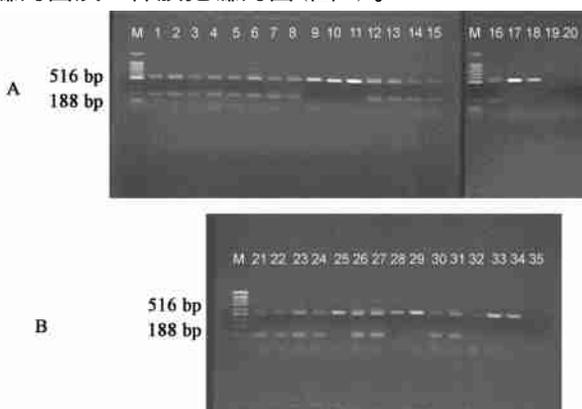


M. 为 DNA 100 bp 标准品;孔 1~9 为 ATCC52529 DNA 模板,含量分别为 1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、500 fg、250 fg、100 fg、50 fg、10 fg;孔 10 为阴性对照 H₂O。

图 3 PCR 反应的敏感性

2.3 串珠镰刀菌的检测结果

以 5 株 ATCC 典型菌株 ATCC 52539、38946、26263 (*Fusarium verticillioides*)、ATCC 12763 (*Fusarium nygamai*) 和 ATCC 38016 (*Fusarium subglutinans*) 为参考,应用 PCR 和复合 PCR 方法,检测了从我国山东、浙江、河南和安徽省的不同试样中分离的 29 株串珠镰刀菌及 3 株胶孢镰刀菌(图 4)。



M. 为 100 bp DNA 标准品;1-35 孔分别为 ATCC 52539、SD-fm032、034、035、036、037、038、SD-fm041、SD-fm043、047、049、Z-fm041、044、048、064、065、禾谷镰刀菌、梨孢镰刀菌、黄曲霉、拟青霉、Z-fm066、AH-fm001、002、003、HN-fm001、006、115、116、118、163、179; 12763、木贼镰刀菌、三线镰刀菌和 L113。

图 4 分离菌株复合 PCR (Fu3/Fu4、Fu5/Fu4) 检测结果

可以看出,其中 25 株串珠镰刀菌及 1 株山东胶孢镰刀菌 SD-fm041 经复合 PCR (Fu3/Fu4、Fu5/Fu4)

检测,扩增结果阳性,均产生 2 条扩增带 516 bp 和 188 bp,说明这些菌株为 rDNA ITS2 I 型;复合 PCR 检测另外 2 株胶孢镰刀菌(SD-fm047 和 SD-fm049) 和 4 株串珠镰刀菌(HN-fm001、HN-fm116、HN-fm118 和 SD-fm 043),只产生 516 bp 的 DNA 片段。但应用引物 Fu3/Fu2 进行 PCR 检测,这 4 株串珠镰刀菌的扩增结果阳性,产生 375 bp 的 DNA 片段,说明它们的 rDNA ITS2 为 II 型;2 株胶孢镰刀菌 SD-fm047 和 SD-fm049 的 PCR 和复合 PCR 检测,引物 Fu3/Fu4 扩增结果阳性,产生 516 bp 的 DNA 片段,而 Fu3/Fu2 和 Fu5/Fu4 扩增结果均为阴性,说明他们的 ITS2 序列高可变区即非 I 型,也非 II 型。

表 4 分离菌株 PCR 和复合 PCR 检测结果

编号	菌株	PCR			多重 PCR	
		Fu3/Fu4	Fu5/Fu4	Fu3/Fu2	Fu3/Fu4 + Fu5/Fu4	
1	ATCC 52539	+	+	-	+	+
2	ATCC 38946	+	+	-	+	+
3	ATCC 26263	+	+	-	+	+
4	ATCC 38016	+	+	-	+	+
5	ATCC 12763	+	-	-	+	-
6	SD-fm031	+	+	-	+	+
7	SD-fm032	+	+	-	+	+
8	SD-fm033	+	+	-	+	+
9	SD-fm034	+	+	-	+	+
10	SD-fm035	+	+	-	+	+
11	SD-fm036	+	+	-	+	+
12	SD-fm037	+	+	-	+	+
13	SD-fm038	+	+	-	+	+
14	SD-fm039	+	+	-	+	+
15	SD-fm040	+	+	-	+	+
16	SD-fm041	+	+	-	+	+
17	SD-fm043	+	-	+	+	-
18	SD-fm047	+	-	-	+	-
19	SD-fm049	+	-	-	+	-
20	Z-fm041	+	+	-	+	+
21	Z-fm044	+	+	-	+	+
22	Z-fm048	+	+	-	+	+
23	Z-fm049	+	+	-	+	+
24	Z-fm052	+	+	-	+	+
25	Z-fm064	+	+	-	+	+
26	Z-fm065	+	+	-	+	+
27	Z-fm066	+	+	-	+	+
28	AH-fm001	+	+	-	+	+
29	AH-fm002	+	+	-	+	+
30	AH-fm003	+	+	-	+	+
31	HN-fm001	+	-	+	+	-
32	HN-fm006	+	+	-	+	+
33	HN-fm115	+	+	-	+	+
34	HN-fm116	+	-	+	+	-
35	HN-fm118	+	-	+	+	-
36	HN-fm163	+	+	-	+	+
37	HN-fm179	+	+	-	+	+
38	<i>F. graminearum</i>	+	-	-	+	-
39	<i>F. poae</i>	+	-	-	+	-
40	<i>F. equiseti</i>	+	-	-	+	-
41	<i>F. tricinctum</i>	+	-	-	+	-
42	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-
43	<i>P. Bainier</i>	-	-	-	-	-
44	<i>E. coli</i> L113	-	-	-	-	-

注:“+”为结果阳性,“-”为结果阴性

共检测 32 株国内分离菌株,分析结果表明,其中 26 株菌的 rDNA ITS2 序列为 I 型,4 株(HN-fm001、HN-fm116、HN-fm118 和 SD-fm043)为 II 型,2 株(SD-fmv047 和 SD-fmv049)分型有待进一步确定(表 4)。

3 讨论

在 100 多年以前,日本首次研究并报道了水稻枯萎病,且将该病的病原菌从广义上命名为“串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)”。实际上这种人为分类具有一定的片面性。在 Nirenberg 和 Nelson 分类系统的基础上,1998 年 O'Donnell^[9]根据多基因序列分析结果,对包括串珠镰刀菌在内的水稻枯萎病赤霉群(*Gibberella fujikuroi* species complex)作了进一步分类学修订。从中分出了 10 多个新种和新组合,原来被鉴定为串珠镰刀菌的菌株,至少被分为 4~5 个不同的种,串珠镰刀菌作为其中的一个种。根据有性阶段的形成,该真菌群至少被分为 8 个不同的交配型(生物种),分别命名为 A、B、C、D、E、F、G 和 H,是形态相似的多型性真菌群。能够产生多种真菌毒素,与人类和动物健康及食品安全密切相关的主要为:交配型 A(*Gibberella fujikuroi* mating population A),即该研究所指的串珠镰刀菌(*Fusarium verticillioides*);交配型 E(*Gibberella fujikuroi* MP-E 或 *Fusarium subglutinans*,胶孢镰刀菌),交配型 D(*Gibberella fujikuroi* MP-D 或 *Fusarium proliferatum*,多誉镰刀菌)。

比较基因库中存在的所有镰刀菌的 18S、5.8S、28S rDNA 及间区 ITS1 和 ITS2 序列,根据保守的 ITS1 序列,我们自行设计了镰刀菌属特异性引物 Fu3 和 Fu4。Fu3 和 Fu4 可扩增镰刀菌属真菌中 88% (45/51)的种。根据 1998 年 O'Donnell 等^[9]关于水稻枯萎病赤霉群中各生物种分子水平的新的分类鉴定方法,串珠镰刀菌种 ITS2 I 型特异性引物 Fu5,虽然与水稻枯萎病赤霉群中的 *F. bulbicola*、*F. guttiforme*、*F. napiforme*、*F. pseudoanthophilum*、*F. sacchari*(MP-B)、*F. bactrioides* 种有交叉反应,但根据是否产生小分生孢子及厚垣孢子等,镜检易于鉴别,这些菌株不产生小分生孢子,且 *F. napiforme* 形成厚垣孢子。串珠镰刀菌种 ITS2 II 型特异性引物 Fu2,与 *F. proliferatum* (MP-D) 和极少数 *F. oxysporium* 菌株有交叉反应,这些菌株可从形态上区别于串珠镰刀菌。Fu2 引物序列还与 *F. fujikuroi* (MP-C) ITS2 II 型序列同源,而实际上,根据 O'Donnell 等^[8,9]的 ITS2 序列对水稻枯萎病赤霉群中生物种的分类,可以推定我们所分离和鉴定的 ITS2 II 型串珠镰刀菌种可能就是 *F. fujikuroi* (MP-C),而非

Fusarium verticillioides。因为只有通过有性阶段才能区别串珠镰刀菌 *Fusarium verticillioides* MP-A 和 *Fusarium fujikuroi* (MP-C)。

O'Donnell 等应用保守的 ITS 引物(ITS5-NL4)和 ITS2 型特异的引物(IF 或 IIF-NL4),建立 PCR 检测方法并证实待检的 45 株镰刀菌皆具有 2 个高度可变的 ITS2 序列,命名为 I 型和 II 型。ITS5-NL4 扩增出的为主要型别,命名为 major ITS2,应用型特异的 PCR 引物扩增的另一个序列为次要型别,命名为 minor ITS2。而我们无论应用保守的 ITS 属还是 ITS2 型特异 PCR 引物,分离菌株只扩增出 I 型或 II 型 ITS2 序列,并未发现每株菌同时存在 2 种可变序列。这点与 O'Donnell 结果不一致,有待进一步研究。

尽管美国菌种保藏中心曾将 ATCC 12763 作为串珠镰刀菌保存,但根据 1998 年 O'Donnell 等关于水稻枯萎病赤霉群中各生物种分子水平的新的分类鉴定方法,确定 ATCC 12763 为该群中的一个生物种 *F. nygamai*,不同于串珠镰刀菌 *Fusarium verticillioides* MP-A,从我们的实验结果也得到证实。

本实验结果与王晓英等^[10]产毒串珠镰刀菌的 PCR 检测结果进行比较,发现我国不同省区分离的所有 rDNA ITS2 序列为 I 型的串珠镰刀菌及胶孢镰刀菌,均为伏马菌素产毒株,与南非菌株 ATCC 52539 一致。而 rDNA ITS2 序列为 II 型的串珠镰刀菌均不产生伏马菌素。

山东分离的胶孢镰刀菌,SD-fmv041 ITS2 高可变区为 I 型,与大多数串珠镰刀菌相同,而胶孢镰刀菌 SD-fmv047 和 SD-fmv049 ITS2 高可变区序列非 I 型或 II 型,需进一步确证。

研究结果表明,PCR 及复合 PCR 具有较好的敏感性和特异性。不同引物的敏感性不同,增加镁离子的浓度可提高引物的敏感性。在图 2B 中,孔 11、12、13 和 14 可见小于 100 bp 的片段,可能是形成的引物二聚体。

参考文献

- [1] Nirenberg H I, O'Donnell K. New *Fusarium* species and combination within the *Gibberella fujikuroi* species complex [J]. *Mycologia*, 1998, 90:434-458.
- [2] Leslie J F, Marasas W F, Shephard GS, et al. Duckling toxicity and the production of fumonisin and moniliformin by isolates in the A and F mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium verticillioides*) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 1182-1187.
- [3] Desjardins A E, Plattner R D. Fumonisin B (1)-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot[J]. *J Agric Food Chem*,

发光细菌检测四环素族抗生素体系的建立

朱金国 刘红霞

(湖南出入境检验检疫局,湖南 长沙 410007)

摘要:为建立快速检测四环素族抗生素残留的方法,采用大量接种快速培养方法,制备出适宜检测用的发光菌检测液,建立了发光细菌检测四环素族抗生素体系。结果表明,在该检测体系条件下,明亮发光杆菌与金霉素、土霉素和四环素的抑制效应作用呈良好的线性关系,菌液与抗生素的作用最佳体积配比为 1:3,相互作用的适宜时间为 60~80 min。该体系对四环素族抗生素的检测灵敏度可达 0.006 25 µg/ml,比传统的杯碟法高 5 倍,具有快速、简便的特点,可作为食品中抗生素残留的一种快速、灵敏的筛选检测方法。

关键词:发光,细菌;四环素类;研究技术

System constructed to detect tetracyclines drug by luminescent bacteria

ZHU Jin-guo, LIU Hong-xia

(Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hunan Changsha 410007, China)

Abstract: Luminescent bacteria have been widely used to monitor water quality and assess the toxicity of substances, but hitherto no reports are available on its use in detecting the biological activity of antibiotics. A rapid cultivating method of massive inoculation was adopted to produce a type of luminescent bacteria suspension suitable for detecting tetracyclines in food samples and a testing system was established. Experiments indicated that the best volume ratio of the bacteria suspension to the tetracycline solution was 1:3 for their interactions, and the best interaction time was approximately 60~80 minutes. Under the system conditions, the inhibiting effects of oxytetracycline, chlortetracycline and tetracycline on the *Photobacterium phosphoreum* presented good linear relationship. The sensitivity of this system in detecting tetracyclines can reach 0.006 25 µg/ml, which is five times higher than that of the traditional cylinder plate method. The system can be used as a rapid and convenient screen method for detecting tetracycline residues in foods.

Key Words: Luminescence, bacterial; Tetracyclines; Investigative Techniques

- 2000, 48(11):5773-5780.
- [4] 李秀芳,刘兴阶,赵红,等.我国部分克山病区和非病区主粮中霉菌的污染调查[J].卫生研究,1996,25(3):157-159.
- [5] Groves F D, Zhang L, Chang Y S, et al. *Fusarium* mycotoxins in core and core products in a high-risk area for gastric cancer in Shandong Province. China[J]. J AOAC Int, 1999, 82(3):657-662.
- [6] Hennequin C, Abachin E, Symens F, et al. Identification of *Fusarium* species involved in human infection by 28S rRNA gene sequencing[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(11):3586-3589.
- [7] Hue F X, Huerre M, Rouffault M A, et al. Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique[J]. J Clin. Microbiol, 1999, 37:2434-2438.
- [8] O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous[J]. Molec Phylogenetics Evol, 1997, 7:103-116.
- [9] O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg H I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex[J]. Mycologia, 1998, 90(3):465-493.
- [10] 王晓英,刘秀梅.串珠镰刀菌伏马菌素产毒株聚合酶链式反应检测方法的研究[J].卫生研究,2003,32(3):228-231.
- [收稿日期:2004-12-26]

中图分类号:R15;Q949.32;TS201.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)02-0145-06

作者简介:朱金国 男 高级工程师