

山西葡萄中链格孢菌分离鉴定与污染水平分析

赵永胜^{1,2*}, 石文鑫^{1,2}, 郝变青^{1,2}, 马利平^{1,2}

- [1. 山西农业大学, 山西功能农产品检验检测中心, 太原 030031;
2. 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(太原), 太原 030031]

摘要: 目的 初步明确山西葡萄(巨峰葡萄和红提葡萄)中链格孢菌的污染水平。**方法** 本研究对山西葡萄主产区的巨峰葡萄和红提葡萄上的链格孢菌进行纯化分离、真菌形态学鉴定、分子生物学鉴定, 并对链格孢菌产毒能力进行检测分析。**结果** 链格孢菌(*Alternaria alternata*)侵染山西葡萄具有品种选择性, 即较巨峰葡萄, 链格孢菌更易侵染红提葡萄。链格孢菌菌株产生的毒素主要以细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid, TeA)为主, TeA 的检出量占总体检出毒素量的 98.14%。**结论** 本研究分离得到山西葡萄中的链格孢菌易侵染红提葡萄, 且产生毒素以 TeA 为主。基于链格孢毒素的毒性、污染范围及对人体的潜在危害, 应加快建立链格孢毒素的限量标准, 同时加强葡萄及其制品的风险监测。

关键词: 病原微生物; 链格孢菌; 山西葡萄

Isolation and identification and analysis of pollution level of *Alternaria*

ZHAO Yong-Sheng^{1,2*}, SHI Wen-Xin^{1,2}, HAO Bian-Qing^{1,2}, MA Li-Ping^{1,2}

- [1. Shanxi Agricultural University, Shanxi Center for Testing of Functional Agro-products, Taiyuan 030031, China;
2. Laboratory of Agro-product Quality and Safety Risk Evaluation (Taiyuan), Ministry of Agriculture, Taiyuan 030031, China]

ABSTRACT: Objective To determine the pollution level of *Alternaria alternata* in Shanxi grape (kyoho grapes and redglobe table grapes) preliminarily. **Methods** *Alternaria alternata* isolated from kyoho grapes and redglobe table grapes in the main grape producing area of Shanxi province were identified by purification, morphology and molecular biology, and the toxin-producing ability of *Alternaria alternate* was analyzed. **Results** The infection of *Alternaria alternata* to grape varieties was selective in Shanxi province, which means the infection of *Alternaria alternata* to redglobe table grapes was more serious than kyoho grapes. The toxin produced by *Alternaria alternata* was mainly TeA, the content of TeA was 98.14% of the total detected toxin. **Conclusion** *Alternaria alternate* isolated from Shanxi grape is easy to infect redglobe table grapes and produced TeA toxin mainly. Based on the toxicity, pollution range and potential harm to human body, it is necessary to set up the limit standard for *Alternaria alternata* toxin and strengthen the risk monitoring of grape and its products.

KEY WORDS: pathogenic microorganism; *Alternaria alternata*; Shanxi grape

基金项目: 2018 年度国家农产品质量安全风险评估项目计划(GJFP201801301)

Fund: Supported by the National Risk Assessment Program for Agricultural Product Quality and Safety in 2018 (GJFP201801301)

*通信作者: 赵永胜, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全风险评估。E-mail: xxszyz@126.com

*Corresponding author: ZHAO Yong-Sheng, Assistant Researcher, Shanxi Center for Testing of Functional Agro-products, No.79, Longcheng Road, Xiaodian District, Taiyuan 030031, China. E-mail: xxszyz@126.com

0 引言

葡萄是中国普遍栽培的水果之一, 具有很高的经济价值。在常温下, 受真菌病害的影响, 采后葡萄极易腐烂。链格孢菌属于丝状真菌, 是一种普遍存在于环境中的病原体和腐生菌, 是导致水果等农产品腐烂变质的主要微生物^[1]。链格孢菌产生的多种次级代谢产物对人或牲畜具有诱变性、致癌性和致畸性等慢性或急性毒性作用^[2]。链格孢菌可引起葡萄多种病害, 如葡萄穗轴褐枯病等, 导致葡萄品质和产量下降, 并且在适宜条件下, 还会累积多种毒素, 威胁消费者的健康^[3]。

本研究针对山西省太原市清徐县、运城市临猗县等葡萄主产区生产及葡萄冷库贮藏不同环节的调查评估, 对巨峰葡萄、红提葡萄样品中链格孢菌进行分离纯化与鉴定, 对样品中链格孢类毒素进行检测分析, 筛选优势菌株, 以期初步明确山西葡萄中链格孢菌的污染水平, 为真菌毒素非定向筛查数据库的建立以及开展毒素风险评估提供有效数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验样品: 从运城市临猗县和太原市清徐县两个主要葡萄种植区及其周边的 39 个基点进行了红提葡萄(redglobe table grapes)和巨峰葡萄(kyoho grapes)样品采集, 共采集 117 份葡萄样品, 每份样品各取 5 个重复样本, 共 585 个葡萄样本。

试剂: 乙酸(纯度>99.7%)、乙腈(纯度>99.9%)、甲醇(纯度>99.9%)、甲酸(纯度>88%)(日本岛津公司); 乙酸铵(纯度>99.0%)(天津市光复精细化工研究所); 氯化钠(纯度>99.0%)、葡萄糖(纯度>99.7%)(天津市申泰化学试剂有限公司); 链格孢酚(alternariol, AOH)(纯度>97.0%)、交链格孢酚单甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)(纯度>99.0%)、细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid, TeA)(纯度>98.0%)、链格孢毒素(altenuene, ALT)(纯度>99.3%)、腾毒素(tentoxin, TEN)(纯度>99.0%)标准品(天津阿尔塔科技有限公司); 琼脂(纯度 99.99% 北京奥博里生物技术有限责任公司)。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基: 200 g 马铃薯切 1 cm³ 块, 煮沸后用 4 层纱布过滤, 再加入 20 g 葡萄糖, 20 g 琼脂, 加入蒸馏水定容到 1 L, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB)培养基: 200 g 马铃薯切 1 cm³ 块, 煮沸后用 4 层纱布过滤, 再加入

20 g 葡萄糖, 加入蒸馏水定容到 1 L, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2 仪器与设备

CX31 显微镜(日本 Olympus 公司); BS-2E 恒温振荡摇床(上海智城分析仪器制造有限公司); SPX-250 恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司); UPLC I-Class XEVO TQ-XS 串联液质联用仪(美国 Waters 公司); BSA323S 天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; 5804 R 离心机(德国 Eppendorf 公司); TBOYS MULTI 多管涡旋混合仪(德国 Troemner 公司); XK80-A 快速混匀器(江苏新康医疗器械有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品采集

从生产环节、贮藏环节采集带腐烂病斑葡萄样品。

1.3.2 病原菌的分离与培养

从样品健康结合部分, 切取 4~5 mm 的小块病组织。70% 的酒精进行表面消毒和灭菌水洗过以后, 接种至 PDA 培养基, 25 °C 避光培养 3~5 d。

1.3.3 病原菌的纯化

从培养的菌落的边缘挑取菌丝体移植, 继续培养 3~7 d, 待菌落长满四分之三培养皿, 观察菌落的培养性状, 并通过显微镜检查, 观察菌种中是否混有其他真菌。按此方法继续纯化, 直至培养出来的菌落单一, 没有混杂其他真菌^[4]。

1.3.4 病原菌的生理小种鉴定

形态学鉴定: 将病原菌接种到 PDA 培养基上, 培养一周后用无菌水冲洗平板并配制孢子悬浮液, 通过观察菌落形态及孢子形态特征, 并与模式菌株进行比对, 鉴定病原菌的分类水平^[5]。

分子生物学鉴定: 从培养的单菌落上挑取适量的菌体, 提取 DNA, 利用 ITS 序列, 通用引物扩增该真菌核糖体 rRNA 基因的 IT1-IT4 序列并测序^[6-7], 将该序列在美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)上进行同源性比对分析, 进一步明确菌株的分类水平。

1.3.5 病原菌的产毒能力鉴定

将纯化后的菌株接种到 PDB 培养基中, 25 °C 培养 14 d, 离心取上清后, 利用 80% 乙腈对毒素(TeA、AOH、AME、ALT、TEN)进行提取, 氮吹, 复溶后利用已经建立的毒素检测方法对菌株的产毒种类和水平进行测定^[8]。

2 结果与分析

2.1 病原微生物的形态学鉴定

将实验样品中分离纯化出的菌株于 25 °C 的 PDA 培

培养基中培养 3~5 d 后, 菌落直径达到 4 cm 左右, 菌落形态呈平展致密的绒毛状, 菌丝的颜色初期是白色, 后期变为浅绿色或墨绿色, 培养基底面为黑色(图 1A)。光学显微镜下 400 倍观察分生孢子形态, 有卵形, 梨形和椭圆形; 分生孢子呈褐色和深褐色, 有横隔膜 1~5 个, 纵隔膜 0~5 个(图 1B、C)。根据菌落特征和《真菌形态鉴定手册》初步确定从样本中分离出的是链格孢霉菌。从 585 个葡萄样品中分离到 41 株链格孢属真菌, 分离率为 7.0%, 其中 38 株为链格孢菌(*Alternaria alternata*), 3 株为细极链格孢(*Alternaria tenuissima*), 表明侵染山西葡萄的链格孢霉以链格孢菌为主。



图 1 链格孢菌菌落形态(A)及分生孢子形态(B、C)

Fig.1 Morphological characteristics of colony (A) and spore (B, C) of *Alternaria alternata*

2.2 病原微生物的分子生物学鉴定

提取各纯化菌株的基因组, 通过 PCR 扩增目的片段, 将扩增片段纯化后送上海生工进行测序。再将测序结果提交至 NCBI 中进行基于局部比对算法的搜索工具(basic

local alignment search tool, BLAST)比对, 被测序的 9 株纯化菌株均与链格孢菌(*Alternaria alternata*)的同源性达到了 100%。系统发育树进一步表明了实验中纯化菌种即为链格孢菌。

2.3 病原微生物侵染选择性

红提葡萄样品中链格孢分离率较高, 分离率为 9.0%, 而巨峰葡萄样品中链格孢的分离率仅为 3.1%, 红提葡萄中链格孢的分离率为巨峰的 2.9 倍, 表明链格孢侵染葡萄具有一定的品种选择性, 侵染红提葡萄比巨峰要严重。

2.4 真菌毒素的提取与检测

葡萄样品链格孢菌株产毒能力结果见表 1, 由表 1 可知: (1)葡萄样品链格孢菌株产生毒素主要类型为 TeA, 而 TEN 产出比较少, 大部分在检出限以下; (2)对各菌株产毒能力^[9]进行分析, 发现 11 株链格孢菌 4 种毒素(TeA、AOH、AME、ALT)检出总量在 49.76~139.75 mg/kg 之间, 为产毒能力较强的菌株。其中, 红提葡萄品种样品菌株 10 株(5 号、12 号、13 号、22 号、24 号、29 号、30 号、37 号、38 号、39 号)、巨峰葡萄品种样品菌株 1 株(21 号); 生产环节 10 株、贮藏环节 1 株。

在供试于真菌毒素检测的 11 株链格孢菌株中(表 1), 累计检测到的 TeA 含量 946.70 mg/kg, 占 TeA、AOH (11.15 mg/kg)、AEM (5.64 mg/kg)、ALT (1.10 mg/kg)、TEN (0.03 mg/kg)总和的 98.14%。链格孢菌菌株产生的毒素主要以 TeA 为主。

表 1 链格孢菌株产毒能力检测结果(mg/kg)
Table 1 Testing results of virulence of *Alternaria alternata* (mg/kg)

菌株序号	TeA	AOH	AME	ALT	TEN	总量
5	44.20	4.40	2.0	0.087	0.008	50.695
12	72.90	0.029	0.016	0.007	0.005	72.957
13	62.30	2.40	0.480	0.021	<0.004	65.201
21	119.90	0.064	0.230	0.011	0.006	120.21
22	137.60	1.30	0.771	0.086	<0.004	139.75
24	70.90	0.01	<0.004	<0.004	<0.004	70.91
29	128.9	0.012	0.005	<0.004	<0.004	128.92
30	115.0	0.08	0.101	0.084	<0.004	115.27
37	94.40	0.023	0.020	0.008	0.006	94.46
38	48.10	0.780	0.598	0.281	<0.004	49.76
39	52.50	2.05	1.42	0.511	<0.004	56.48

3 结论与讨论

本研究主要明确了链格孢菌为侵染山西葡萄的主要病原微生物。链格孢菌菌株产生的毒素主要以 TeA 为主。链格孢菌是存在于果品中的主要真菌种类^[10], 而 TeA 是链格孢菌毒素中最为重要的一种, 可广泛污染蔬菜、水果和谷物^[11]。鲜食葡萄表皮中 TeA 含量最高^[12]、毒性最强^[13-14]。影响链格孢毒素形成除水分、温度、光照等因素外, 还包括营养基质等因素。链格孢菌在不同营养基质中所产生物毒素含量存在差异^[15-16]。卢春珍等^[17]研究发现梨链格孢菌利用不同营养基质所产生物毒素结构种类相同, 但含量存在显著差异。万佐玺等^[18]研究发现病原真菌体外培养的产毒能力与培养条件密切相关, 不同的固体培养基对同一菌株产毒影响差异明显, 而不同的液体培养基对菌株产毒影响差异不明显。本研究对不同葡萄样品中的链格孢菌菌株在同一液体营养基质中所产生物毒素进行了研究, 结果表明不同品种葡萄样品中分离的链格孢菌菌株的产毒量存在差异。另一方面, 不同农作物以及同一农作物的不同品系对链格孢的易感性亦不相同^[19], 本研究也表明, 链格孢菌 (*Alternaria alternata*) 侵染葡萄具有品种选择性, 与巨峰葡萄品种相比, 链格孢菌更倾向于侵染红提葡萄品种, 但此现象的成因和机制有待进一步研究。

链格孢毒素直接危及农产品食用安全, 防控链格孢病害的发生和危害已成为保障农业安全生产的重要研究课题之一^[20]。目前全世界范围内都没有制定链格孢霉菌毒素的限量标准^[21], 我国只规定了出口水果蔬菜中链格孢菌毒素的检出限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 鉴于其毒性、污染范围及对人体的潜在危害, 程家兴等^[22]建议扩大链格孢菌毒素含量检测范围到其他果蔬中, 结合中国人饮食习惯和数据, 更加准确评估中国人链格孢菌毒素的日暴露量。同时, 应加快建立链格孢霉菌毒素的限量标准, 加强葡萄及其制品的风险监测, 从而更好地为食品安全保驾护航。

参考文献

- [1] 孙霞. 链格孢属真菌现代分类方法研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006.
SUN X. The methodological study on the taxonomy of the genus *Alternaria* nees [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2006.
- [2] 周海恩, 陶能国, 贾雷. 一株柑橘采后酸腐病菌的分离与鉴定[J]. 湘潭大学(自然科学), 2013, 37(1): 92-96.
ZHOU HE, TAO NG, JIA L. Isolation and identification of a sour rot of citrus fruits [J]. J Xiangtan Univ (Nat Sci Ed), 2013, 37(1): 92-96.
- [3] 吴文能, 吉宁, 雷卿卿. 贵州水晶葡萄病原真菌分离鉴定及室内抑菌活性测试[J]. 农药, 2020, 59(2): 135-139.
WU WN, JI N, LEI JQ. Isolation, identification and pharmaceutical screening pathogenic fungi from crystal grape in Guizhou [J]. Agrochemicals, 2020, 59(2): 135-139.
- [4] 徐灵春, 杨文茜, 孙和龙. 一株产毒素葡萄链格孢菌的分离及鉴定[J]. 湘潭大学(自然科学), 2017, 39(2): 49-54.
XU LC, YANG WH, SUN HL. Isolation and identification of a fungus producing mycotoxins from grapes fruits [J]. J Xiangtan Univ (Nat Sci Ed), 2017, 39(2): 49-54.
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
WEI JC. Manual of identification of fungi [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979.
- [6] 黄津津, 姚婷, 王友升. 10 株葡萄源丝状真菌分离鉴定及其致病力分析[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(4): 46-54.
HUANG JJ, YAO T, WANG YS. Identification and pathogenicity analysis of ten filamentous fungi from grape fruit and leaves [J]. J Food Sci Technol, 2018, 36(4): 46-54.
- [7] 刘艳梅, 朱建兰, 杨航宇. 曲霉基因组 DNA 提取方法研究[J]. 西北农业学报, 2009, 18(2): 55-58.
LIU YM, ZHU JL, YANG HY. The study of genomic DNA extraction in *Aspergillus* [J]. Acta Agric Boreali-occidentalis Sin, 2009, 18(2): 55-58.
- [8] 曾芹, 师俊玲, 刘延琳. 产白藜芦醇葡萄内生菌的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 167-170.
ZENG Q, SHI JL, LIU YL. Isolation and identification of a resveratrol-producing endophytic fungus from grape [J]. Food Sci, 2012, 33(13): 167-170.
- [9] 蒋黎艳, 赵其阳, 龚蕾. 超高效液相色谱串联质谱法快速检测柑橘中的 5 种链格孢霉菌毒素[J]. 分析化学, 2015, 43(12): 1851-1858.
JIANG LY, ZHAO QY, GONG L. Rapid determination of five *Alternaria* mycotoxins in citrus by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2015, 43(12): 1851-1858.
- [10] 李志霞, 聂继云, 闫震, 等. 果品主要真菌毒素污染检测、风险评估与控制研究进展[J]. 中国农业科学, 2017, 50(2): 332-347.
LI ZX, NIE JY, YAN Z, et al. Progress in research of detection, risk assessment and control of the mycotoxins in fruits and fruit products [J]. Scia Agric Sin, 2017, 50(2): 332-347.
- [11] 吴春生, 马良, 江涛, 等. 链格孢霉菌毒素细交链格孢菌酮酸的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 295-301.
WU CS, MA L, JIANG T, et al. A review on tenuazonic acid, a toxic produced by *Alternaria* [J]. Food Sci, 2014, 35(19): 295-301.
- [12] 张伟, 刘保友, 臧宏伟, 等. 鲜食葡萄表皮生物性危害因子及链格孢毒素分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2019, (4): 36-40.
ZHANG W, LIU BY, ZANG HW, et al. Analysis of biological hazardous factors and *Alternaria* toxins of table grape epidermis [J]. Sino-Overseas Grapevine Wine, 2019, (4): 36-40.
- [13] FERNÁNDEZ-CRUZ ML, MANSILLA ML, TADEO JL. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications [J]. J Adv Res, 2010, (1): 113-122.
- [14] 范盈盈, 马玉珊, 田维娜, 等. 农产品中链格孢毒素形成的影响因素及其研究[J]. 农产品质量与安全, 2020, (6): 22-28.
FAN YY, MA YS, TIAN WN, et al. The study on the factors affecting the formation of *Alternaria* toxin in agricultural products [J]. Qual Saf Agro-Prod, 2020, (6): 22-28.
- [15] 李明远, 严红, 柯常取, 等. 茄链格孢在人工培养基上产毒规律的研究[J]. 华北农学报, 1990, (4): 116-119.
LI MY, YAN H, KE CQ, et al. A study of regular pattern for toxin production of *Alternaria sonani* on media [J]. Acta Agric Boreali-Sin,

- 1990, (4): 116–119.
- [16] 甄应中, 韩绍印, 王秀林, 等. 关于链格孢的毒性及其产毒条件的研究[J]. 真菌学报, 1988, 7(4): 245–251.
ZHEN YZ, HAN SY, WANG XL, *et al.* The study of toxicity and condition of toxin production of *Alternaria alternata* [J]. *Mycosystema*, 1988, 7(4): 245–251.
- [17] 卢春珍, 万传星. 梨黑斑链格孢菌次生代谢产物的分离鉴定及毒素含量分析[J]. 塔里木大学学报, 2020, 32(3): 14–20.
LU CZ, WAN CX. Isolation and identification of secondary metabolites from *Alternaria gaisenas* well as biotoxins content analysis [J]. *J Tarim Univ*, 2020, 32(3): 14–20.
- [18] 万佐玺, 周光来, 强胜. 链格孢菌产毒菌株及产毒培养基的筛选[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2001, 19(3): 7–10.
WAN ZX, ZHOU GL, QIANG S. Screening of toxin-producing strain and toxin-producing medium of *Alternaria alternata* [J]. *J Hubei Minzu Univ (Nat Sci Ed)*, 2001, 19(3): 7–10.
- [19] 李凤琴. 链格孢毒素及其食品卫生问题[J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(6): 45–49.
LI FQ. The question of food safety on *Alternaria* toxin [J]. *Chin J Food Hyg*, 2001, 13(6): 45–49.
- [20] 王婧, 翟伟卜, 高环, 等. 链格孢引起的病害严重危害农作物生产并危及农产品安全[J]. 植物保护, 2017, 43(4): 9–15.
WANG J, ZHAI WP, GAO H, *et al.* Serious damage to crop production caused by *Alternaria* diseases and the safety of agricultural products [J]. *Plant Prot*, 2017, 43(4): 9–15.
- [21] 郭诗曼, 冯启. 链格孢霉菌毒素的研究进展[J]. 广州化工, 2020, 48(17): 9–12
GUO SM, FENG Q. Research progress on *Alternaria* toxins [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2020, 48(17): 9–12.
- [22] 程家兴, 黎明阳, 杨雨希, 等. 红枣中 4 种链格孢菌毒素的检测及风险评估[J]. 分析测试学报, 2018, 37(11): 1334–1338.
CHENG JX, LI MY, YANG YX, *et al.* Determination and risk assessment of four *Alternaria* mycotoxins in Jujube [J]. *J Instrum Anal*, 2018, 37(11): 1334–1338.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



赵永胜, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全风险评估。
E-mail: xxszys@126.com