

產生伏馬鐮孢毒素 B₁ 之鐮孢菌鑑定與其產毒的影響因子

林秀榮¹ 鄧資新² 林宗俊¹ 范揚廣³ 黃振文^{1,4}

¹ 臺中市 國立中興大學植物病理學系

² 臺中市 國立中興大學農藝學系

³ 臺中市 國立中興大學動物科學系

⁴ 聯絡作者，電子郵件：jwhuang@dragon.nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2285-1676

接受日期：中華民國 99 年 9 月 27 日

摘要

林秀榮、鄧資新、林宗俊、范揚廣、黃振文. 2010. 產生伏馬鐮孢毒素 B₁ 之鐮孢菌鑑定與其產毒的影響因子. 植病會刊 19: 191-200.

自水稻與玉米穀粒上分離鐮孢菌屬 *Liseola* 群真菌，共獲得 16 菌株。隨後以 Fumonisin kit 及 HPLC 檢測各菌株是否可產生伏馬鐮孢毒素 B₁ (fumonisin B₁, FB₁)，結果發現 ST-P01 (來自玉米飼料)、PR-14、PR-44 及 PR-143 (來自稻穀) 等四株菌株均具有產生 FB₁ 毒素的能力；其中以 ST-P01 菌株產生 FB₁ 毒素的量最高，達 518.52 ppm。利用孢子形態、大小、產孢方式及比對核糖體 DNA (rDNA) 之 LSU-D1/D2 區域序列等方法，將這些菌株的學名鑑定為 *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg。進一步，利用玉米液態培養基培養 ST-P01 菌株，評估培養溫度、日數、培養基質種類等因子對其產生 FB₁ 毒素的影響，結果發現靜置培養 ST-P01 五日後，才可測到 FB₁ 毒素的產生，且在 32°C 的產毒量最高。以小麥、燕麥、裸麥、蕎麥、糙米、紫糯米、白米、小米及玉米等九種液態培養基質分別培養 ST-P01 菌株，結果發現其在紫糯米粉液態培養基產生 FB₁ 毒素的量最高，達 35.43 ppm，其次在玉米粉液態培養基上的產量則為 34.35 ppm；至於以裸麥粉液態培養的產毒量最少，僅有 2.96 ppm。

關鍵詞：伏馬鐮孢毒素 B₁、鐮孢菌屬、*Fusarium proliferatum*、培養因子、真菌毒素

緒言

伏馬鐮孢毒素 (fumonisins) 主要是由鐮孢菌屬 (*Fusarium* spp.) 真菌所產生的二次代謝物，由於二次代謝物對某些生物體具有生理上的作用，故於劑量到達一定濃度以上，即可能導致生物體的中毒或甚至死亡。在西元 1902 年，科學家發現餵食過量發霉玉米之馬匹，會中毒死亡，故稱為發霉玉米中毒症 (moldy corn poisoning)⁽³⁾。1988 年，Gelderblom 等人⁽⁹⁾ 自黴菌汙染的玉米分離出 *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg [同種異名為 *Fusarium moniliforme* (Matsushima) Nirenberg]，同時在培養該菌的培養基中萃取出伏馬鐮孢毒素，並於同年 Bezuidenhout 等人⁽¹⁾ 確定該毒素之化學結構，在臨牀上該毒素會造成動物多種致命性

之疾病，且針對不同的動物會傷及特定之標的器官，例如伏馬鐮孢毒素會造成馬的腦白質部軟化症 (equine leukoencephalomalacia, ELEM)⁽¹¹⁾ 外，亦會造成豬的肺水腫⁽¹⁰⁾、大鼠肝病、肝及腎腫瘤⁽⁹⁾ 等，並且可使禽類的免疫系統受到干擾和造成肝腎的受傷，甚至會產生體重不足與死亡的現象⁽⁶⁾。伏馬鐮孢毒素 B₁ (FB₁) 主要於玉米或是以玉米為基質之食物中發現，在美國^(19, 24)、巴西⁽²⁰⁾、西班牙⁽⁵⁾、墨西哥⁽¹⁸⁾、愛爾蘭⁽¹⁶⁾、南非及埃及⁽²²⁾ 等國家亦已有記錄。具有產生 FBs 毒素能力之真菌有：*Fusarium* 屬的 *F. verticillioides* (*F. moniliforme* Sheldon)、*F. proliferatum* (Mastushima) Nirenberg、*F. nygamai* Burgess and Trimboli、*F. napiforme* Marasas, Nelson and Rabie、*F. dlamini* Marasas, Nelson and Tousson、*F.*

oxysporum var. *redolens*、*F. anthophilum* (A. Braun) Wollenw等⁽¹⁷⁾以及 *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*⁽⁷⁾，其中又以 *F. verticillioides* 之產毒能力最強。本研究主要目的在於：(1) 分離與鑑定穀物與飼料中具有產生 FB₁ 毒素能力的鐮孢菌；(2) 調查市售穀物與飼料中 FB₁ 毒素的含量；(3) 比較鐮孢菌在不同基質產生 FB₁ 毒素的劑量，祈能進一步瞭解臺灣穀物遭受本毒素污染的情況。

材料與方法

菌株分離與鑑定

將國立中興大學動物科學系營養與毒物實驗室提供之飼料及苗栗區農業改良場所提供之稻穀，分別以五氯硝苯選擇性培養基 (Nash-PCNB)⁽¹⁴⁾ 分離鐮孢菌，待 3~5 天後，切取菌絲尖端置於 2% 水瓊脂培養基 (water agar, WA) (Difco, USA) 平板上培養 5 天，再逐一取菌絲尖端移至馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar; PDA, Difco, USA) 培養，各菌株經單孢分離純化後，分別給予代號為 PF-01、PF-02、ST-P01、PT-11、PT-12、PT-21、PR-14、PR-31、PR-32、PR-34、SR-35、PR-42、PR-44、SR-45、SR-135 及 PR-143。待其產孢後，觀察菌落形態、顏色、產孢構造及分生孢子等形態。

伏馬鐮孢毒素 B₁回收率之測試

固態回收率之測試：將濃度 100 ppm 的 FB₁ 毒素標準品 0.25、0.5、0.75 及 1 毫升分別加入 10 克乾玉米粒，待液體風乾後，將玉米粒磨成粉狀。將磨碎之樣品，以 18 網目之網篩過篩後，取 10 克樣品加入乙腈 (Acetonitrile)：甲醇 (Methanol)：水 = 1 : 1 : 2 之溶液 40 毫升萃取，均勻攪拌 3 min，置於 3D 震盪器上震盪 30 min 後，以 6000 rpm 速度離心 20 min，取上清液備用。液態回收率測試：將 5 克玉米粉 (過 18 網目鐵篩) 加 50 毫升蒸餾水於 125 毫升三角瓶，以秤藥紙與濾紙封住瓶口，經高溫高壓滅菌，冷卻後分別加入 100 ppm FB₁ 毒素標準品 0.25、0.5、0.75 及 1 毫升於玉米液態培養基中，將液態樣品均勻攪拌 3 min，置於 3D 震盪器上震盪 30 min 後，以 6000 rpm 速度離心 20 min，取上清液備用。然後分別由固態或液態樣品萃取 3 ml 上清液加入 8 ml 之甲醇 (3)：水 (1) 溶液 (solution 1)，混合均勻後將其 pH 值調至 6-9 間，以伏馬鐮孢毒素純化管柱 (fumonisin clean-up column) 提取毒素，再以 11 ml [solution 1 (8) : 甲醇 (3)] (solution 2) 洗滌純化管

柱，最後以 10 ml 之甲醇 (99) : 醋酸 (1) 混合溶液 (solution 3) 將伏馬鐮孢毒素自純化管柱中沖提出，並收集於樣品瓶中，再以減壓濃縮方式將樣品濃縮乾燥之，隨後以 1 ml 之乙腈與等體積水之混合溶液回溶待測。將前述之樣品或 FB₁ 毒素之標準溶液以 0.22 μm 濾膜過濾後，精確量取檢液 50 μl 置於褐色或避光之玻璃瓶中，加入鄰苯二甲醛試劑 (OPA 試劑) 50 μl，均勻振盪 30 sec，經過 3 min 反應後，取其衍生物立即精確量取 20 μl 溶液注入高效液相層析儀 (HPLC) 中進行分析。分析之各種條件分別為層析管柱：RP-18，5 μm，內徑 4.6 mm × 15 cm；螢光檢出器：激發波長 335 nm，發射波長 440 nm；移動相溶液：將甲醇及 0.1 M 磷酸二氫鈉溶液以 77 : 23 (v/v) 比例均勻混合，並以磷酸調整 pH 至 3.35 後，以 0.45 μm 濾膜過濾之，再以超音波振盪 30 min，去除濾液中的氣體後，供作移動相溶液；移動相流速：1.0 mL/min。比較衍生化檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間，藉以鑑別伏馬鐮孢毒素，並依檢量線求得樣品中 FB₁ 毒素之含量，進一步與標準品量取之標準曲線比對，回推樣品濃度，再除以初始濃度，即求得回收百分率。

菌株產毒能力測試

將 16 個供試菌株，分別置於 PDA 培養待產孢後，取 1 ml 孢子懸浮液 (1×10^5 conidia/ml) 加入 100 ml 的馬鈴薯葡萄糖液體培養基 (potato dextrose broth; PDB, Difco, USA) 中，於 32°C 下震盪培養 7 天後，離心 (5000 rpm) 取上清液，利用伏馬鐮孢毒素偵測套組法 (AgraQuant Fumonisin (0.25-5.0 ppm) Test KIT, Romer Labs[®], Inc. U.S.A) 快速測定 FB₁ 毒素之產量。檢測步驟與方法：取上清液 3 ml 加入 7 ml 100% 的甲醇，均勻混合 3 min 後，以 5000 rpm 離心 10 min，再以 0.45 μm 濾膜過濾。然後加 conjugate 反應液 (一) 200 μl 到稀釋槽 (dilution well) 中，並取 100 μl 標準品/樣品至稀釋槽中與反應液 (一) 混合均勻後，取 100 μl 混合液至反應槽 (coated well)，靜置 15 min 之後，將溶液倒除，以過濾水或去離子水洗滌 3 至 5 次，最後將水分去除，再加 100 μl substrate 反應液 (二)，反應 5 min 後，加入 100 μl 的 stop 反應液 (三)，在 450 nm 下讀取吸光值，並與標準品製成之標準曲線比對，回推樣品濃度，以偵測 FB₁ 毒素之產量。

具產毒能力菌株之分生鑑定

根據產毒能力試驗之結果，選取具有產生 FB₁ 毒素之菌株，其代號分別為 ST-P01、PR-14、PR-44 及 PR-143，將其培養於 PDA 培養基上，經過 7 天後，以

移植環刮取少量的菌絲，移入高溫高壓 (121°C, 15 lb, 20 min) 滅菌過之 1.5 ml 離心管內，微波 (600~700W) 6 min。為增加 DNA 萃取之效率，用滅菌過之研磨棒壓碎微波過之菌絲後，加入 50 μl 之 TE 緩衝液 (TE buffer, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5; 1 mM EDTA)，震盪 30 sec 後，以 14,000 rpm 離心 3 min。吸取上清液至另一個滅菌過之 1.5 ml 離心管內。將 ST-P01、PR-14、PR-44 及 PR-143 菌株之 DNA 進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅核糖體 DNA (rDNA) 之 LSU-D1/D2 區域序列。PCR 反應溶液中含 10 μM NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 及 10 μM NL4 (5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3')^(15, 23) 引子對，各有 0.5 μl、H₂O 18 μl、PCR master mix kit (1.25 μl polymerase; 1.25 μl reaction buffer; 1.25 μl 1.75 mM CaCl₂; 1.25 μl 200 μM dNTP, GeneMark) 5 μl 及上述菌株萃取之 DNA 模板 1 μl，總反應體積為 25 μl。混合均勻後放入聚合酶連鎖反應機中 (型號 TC-96-G, Infinigen Biotechnology Inc.)，反應條件為 95°C, 2 min；95°C, 30 sec、55°C, 30 sec、72°C, 2 min，共 35 個循環；72°C, 5 min。

將增幅反應之 PCR 產物以 1.5% (w/v) TAE (40 mM Tris, 20 mM Sodium Acetate, 1 mM pH 7.5 EDTA) 瓊脂凝膠進行電泳分析，其增幅之 LSU-D1/D2 條帶約 500 bp。將 PCR 產物送往源資生物科技股份有限公司定序，並將定序後的序列與 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站上所登錄之資料庫進行菌株序列分析比對。

市售穀類與飼料含伏馬鎌孢毒素 B₁ 之調查

穀類樣品自一般商店購得，穀類樣品種類包括小麥、燕麥、裸麥、蕎麥、糙米、紫糯米、白米、小米及玉米等共九種。此外，由國立中興大學動物科學系營養與毒物實驗室提供飼料，包括中豬料、大豬料、母後料、公豬料、肉雞飼料、鰐料、虱目魚飼料及鱸魚飼料等共八種。將諸樣品三重複經固態萃取及純化後，取濾液以 1N 氢氧化鈉或 1N 鹽酸調整 pH 值至 6-9 間，然後以 HPLC 測定各飼料含有 FB₁ 毒素之情形。

培養溫度、天數及基質種類對供試菌株產生伏馬鎌孢毒素 B₁ 之影響

最適產毒溫度及天數試驗：穀類磨粉使其通過 18 網目鐵篩，取 2.5 克穀類粉末置於 125 ml 三角燒瓶，加 50 ml 過濾水，經高溫高壓滅菌 (121°C, 15 lb)，製成液態培養基，冷卻後備用。將標準菌株 ST-P01 孢子懸浮液 1 ml (1×10^5 conidia/ml) 加入玉米粉液態培養基，

置於 16、20、24、28、32 及 36°C 定溫培養箱中靜置培養，經過 0、5、10、15 及 20 天後，以方法二之液態萃取法，經純化後，利用 HPLC 測定 FB₁ 毒素之產量。

培養基基質種類對供試菌株產毒的影響：將供試菌株 ST-P01 孢子懸浮液 1 ml (1×10^5 conidia/ml)，分別加入以小麥、燕麥、裸麥、蕎麥、糙米、紫糯米、白米、小米及玉米等磨成粉製成液態培養基中，於 32°C 之定溫培養箱中靜置培養 10 天，以前述液態萃取法，經純化後，利用 HPLC 測定各處理產生 FB₁ 毒素之濃度。

結 果

菌株分離與鑑定

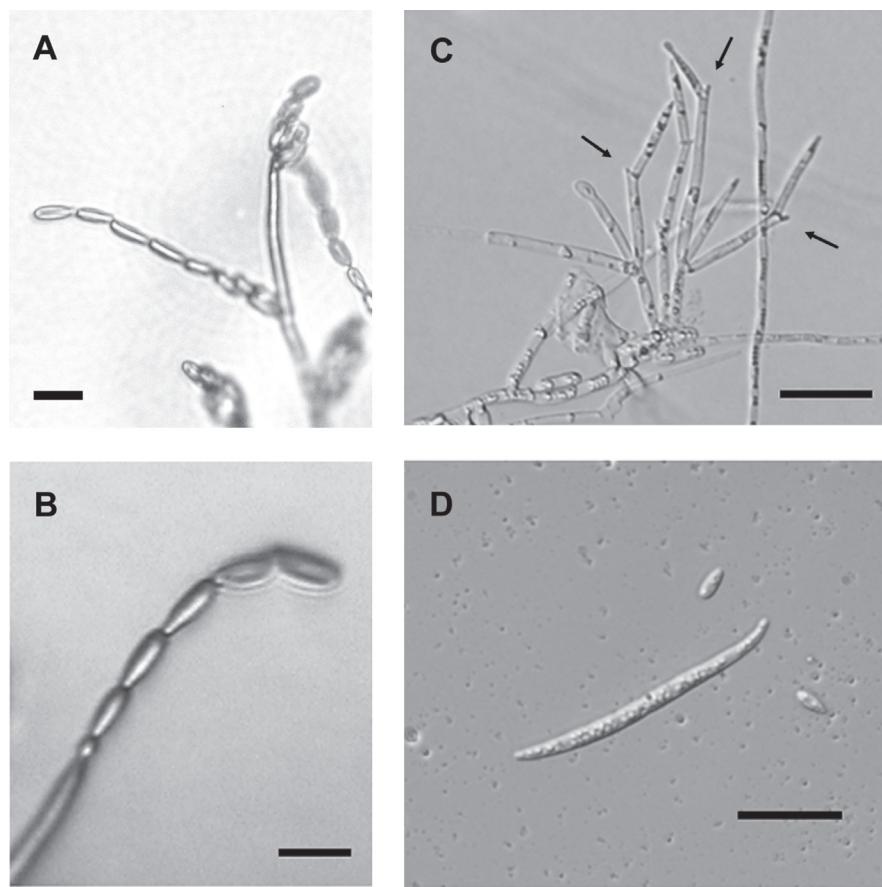
由供試之穀類中共分離得 16 菌株，待其產孢後，經由觀察菌落的形態、顏色、產孢構造及分生孢子等特性，鑑定所得的菌株分別是 *F. proliferatum* 及 *F. subglutinans*，其中代號為 SR-45 及 SR-135 兩株菌是 *F. subglutinans*，其餘 14 株菌皆屬於 *F. proliferatum*。*F. proliferatum* 產孢構造為複瓶狀枝 (圖一, C)，小分生孢子呈鏈狀 (圖一, A、B)；於 PDA 培養基上培養，菌落有紫色色素產生；大孢子呈細長鎌刀狀，具足細胞 (圖一, D)。*F. subglutinans* 於 PDA 培養基上培養，菌落為淡橘至粉紅色，大孢子呈鎌刀狀，具足細胞。小孢子呈假頭狀排列。

伏馬鎌孢毒素 B₁回收率之測試

以液態及固態培養基來測試伏馬鎌孢毒素 B₁ 毒素之回收率，所得之試驗結果如表一。另外，FB₁ 毒素標準品以 HPLC 進行分析，其結果如圖二，波峰的滯留時間為 8.1 min。以定量之標準品加入液態培養基測得之回收率分別為 111.1、104.2、95.9 及 95.9%，固態培養基測得之回收率則分別為 97.7、95.3、99.9 及 98.6%，無論液態或固態培養基經純化萃取測得之回收率皆達 95% 以上。

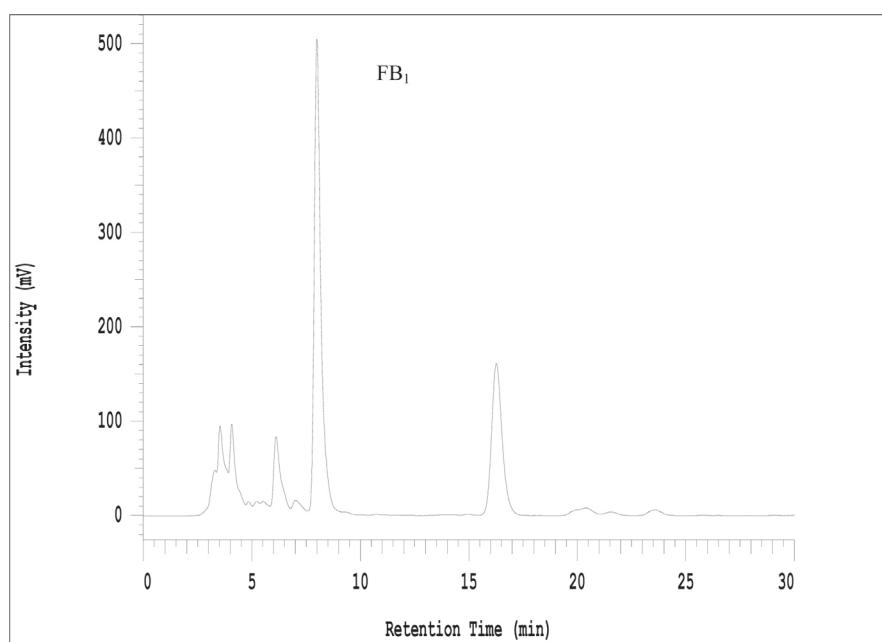
菌株產毒能力測試

將稻穀及玉米飼料以 Nash-PCNB 選擇性培養基分離得鎌孢屬真菌，菌株產孢後共分離得 16 菌株，經產毒能力測試結果，得知 ST-P01、PR-14、PR-44 及 PR-143 菌株具有產生 FB₁ 毒素之能力 (表二)，它們產生 FB₁ 毒素的量分別為 518.52、4.03、50.33 及 26.84 ppm，其中以玉米飼料中分到的 ST-P01 菌株產毒能力最佳。



圖一、*Fusarium proliferatum* ST-P01 菌株的形態。(A、B) 小分生孢子鏈生，(C) 複瓶狀枝之產孢構造，(D) 大孢子呈細長鐮刀狀，具足細胞。

Fig. 1. Morphology of *Fusarium proliferatum* isolate ST-P01. (A & B: spores in chain, bar = 10 μm ; C: poly-phialides, bar = 20 μm ; D: macroconidium and microconidia, bar = 20 μm)



圖二、Fumonisin B₁ 標準品以 HPLC 分析的圖譜。

Fig. 2. HPLC spectrum of standard Fumonisin B₁.

表一、液態及固態玉米培養基之伏馬鎌孢毒素 B₁ 回收率Table 1. Fumonisin B₁ recovery rate from liquid and solid corn media

Fumonisin B ₁ conc. (ppm)	Liquid	Recovery rate (%) ¹	Solid
25	111.1		97.7
50	104.2		95.3
75	95.9		99.9
100	95.9		98.6

¹ Fumonisin B₁ analyzed by high-performance liquid chromatography.

表二、自不同地區採集玉米飼料、水稻植株及稻穀所分離之鎌孢菌屬真菌產生伏馬鎌孢毒素 B₁ 的情形Table 2. Sources of *Fusarium* isolates obtained from corn feed, rice plant, and unhusked rice and fumonisin B₁ production by those cultured in potato dextrose broth for 7 days

Isolates	FB ₁ Conc. (ppm) ¹	Source
PF-01	0	Feed (corn kernel ²)
PF-02	0	Feed (corn kernel ²)
ST-P01	518.52	Feed (corn kernel ²)
PT-11	0	Rice plant
PT-12	0	Rice plant
PT-21	0	Rice plant
PR-14	4.03	Rice (Taoyuan no.1)
PR-31	0	Rice (Tainan no.11)
PR-32	0	Rice (Tainan no.11)
PR-34	0	Rice (Tainan no.11)
SR-35	0	Rice (Tainan no.11)
PR-42	0	Rice (Taiken no.14)
PR-44	55.33	Rice (Taiken no.14)
SR-45	0	Rice (Taiken no.14)
SR-135	0	Rice (Taiken no.8)
PR-143	26.84	Rice (Taiken no.9)

¹ Fumonisin B₁ analyzed by Fumonisin quantitative kit.

² Major ingredient is corn kernel.

具產毒能力菌株之分生鑑定

挑選具有產毒能力之 ST-P01、PR-14、PR-44 及 PR-143 菌株，利用 rDNA 之 LSU-D1/D2 區域序列 (圖三) 之分子生物技術鑑定，發現四株菌株之序列與 NCBI data base 之 *F. proliferatum* (GenBank accession number FJ890385) 達 99% 之相似度，配合前述形態與產孢特徵，佐證此四株菌皆為 *F. proliferatum*。

市售穀類與飼料含伏馬鎌孢毒素 B₁ 之調查

市售穀類包含小麥、燕麥、裸麥、蕎麥、糙米、紫糯米、白米、小米及玉米等九種，經過萃取純化分析後，得知含有 FB₁ 毒素之穀類如圖四，其中糙米中 FB₁ 毒素含量達 4 ppm，紫糯米含量為 0.0595 ppm。此外，中豬料、大豬料、母後料、公豬料、肉雞飼料、鰻料、虱目魚飼料及鱸魚飼料等市售飼料，經分析結

果發現此八種飼料皆含有 FB₁ 毒素 (圖五)，各飼料中 FB₁ 毒素之含量介於 0.07-1.27 ppm 間，其中以公豬飼料中 FB₁ 毒素含量最高，鰻魚飼料最低。

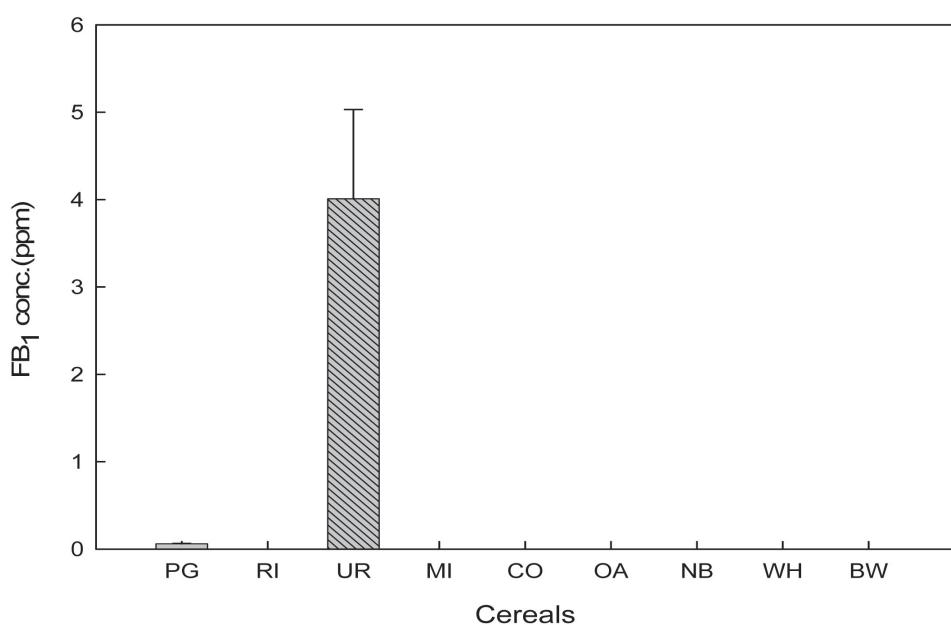
培養溫度、天數及基質種類對供試菌株產生伏馬鎌孢毒素 B₁ 之影響

最適產毒溫度及培養天數試驗：在 16、20、24、28、32 及 36°C 下分別以玉米粉液態培養基培養 ST-P01 菌株，結果如圖六所示，其於各溫度下，皆在培養第 5 天後開始有毒素之產生，其中以在 28°C 及 32°C 培養 10 日後，有明顯的 FB₁ 毒素累積。在 32°C 培養 10 日後，產毒量逐漸達 300 ppm，之後產量即不隨培養日數增加。在 28°C 培養 15 天後，FB₁ 毒素產量仍持續累積，培養 20 天後 FB₁ 毒素產量超過 200 ppm。其餘溫度 16、20、24 及 36°C 培養 20 天後 FB₁ 毒素產量皆低於 100 ppm。

STP-01	TCAAATTGAAATCTGGCTCTGGGGCCGA	GTTGTAATTTAGAGGATA	CTTTGATGCCGTGCCTTCC	GAGTTCCC				
PR-143				
PR-14				
PR-44				
STP-01	TGGAACGGGA	CGCCCATAGAG	GCTGAGAGCC	CCGCTCGTT	GGATGCCAAA	TCTCTGTAAA	GTTCCTTCGA	CGACTCGA
PR-143
PR-14
PR-44
STP-01	GTAGTTGGG	AATGCTGCTC	TAAATGGGAG	GTATATGTCT	TCTAAAGCTA	AATACGGCC	AGAGACCGAT	AGCCACAA
PR-143
PR-14
PR-44
STP-01	ACTAGAGTCA	TCGAAAGATG	AAAAGCACTT	TGAAAAAGAGA	GTTAAAAAGT	ACGTGAATT	GTTCAGAGGG	AAGCGTTT
PR-143
PR-14
PR-44
STP-01	ATGACCAGAC	TTGGGCTTGG	TTAATCATCT	GGGGTTCTCC	CCAGTGCACT	TTTCCAGTCC	AGGCCAGCAT	CAGTTTC
PR-143
PR-14
PR-44
STP-01	CCCCGGGGAT	AAAGACTTCG	GGAAATGTGGC	TCTCTTCGGG	GAGTGTTATA	GCCCCTTGTG	TAATACCCCTG	GGGGGGAC
PR-143	T
PR-14
PR-44	G	C
STP-01	TGAGGTTCGC	GCATCTGCAA	GGATGCTGGC	GTAAATGGTCA	TCAACGACCC	GTCT		
PR-143
PR-14
PR-44

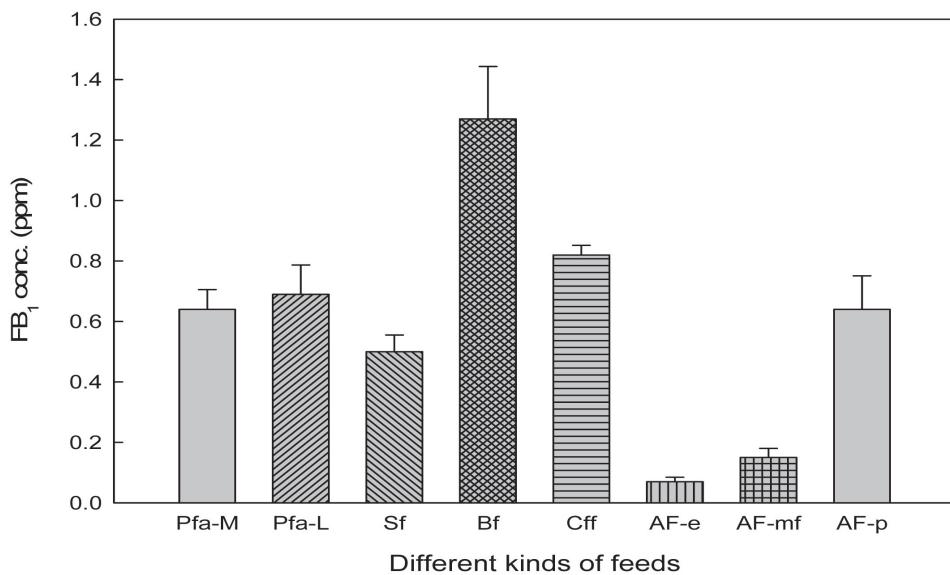
圖三、*Fusarium proliferatum* ST-P01、PR-14、PR-44 及 PR-143 菌株之 LSU-D1/D2 區域序列。

Fig. 3. The LSU-D1/D2 sequences of *Fusarium proliferatum* isolates ST-P01, PR-14, PR-44, and R-143.



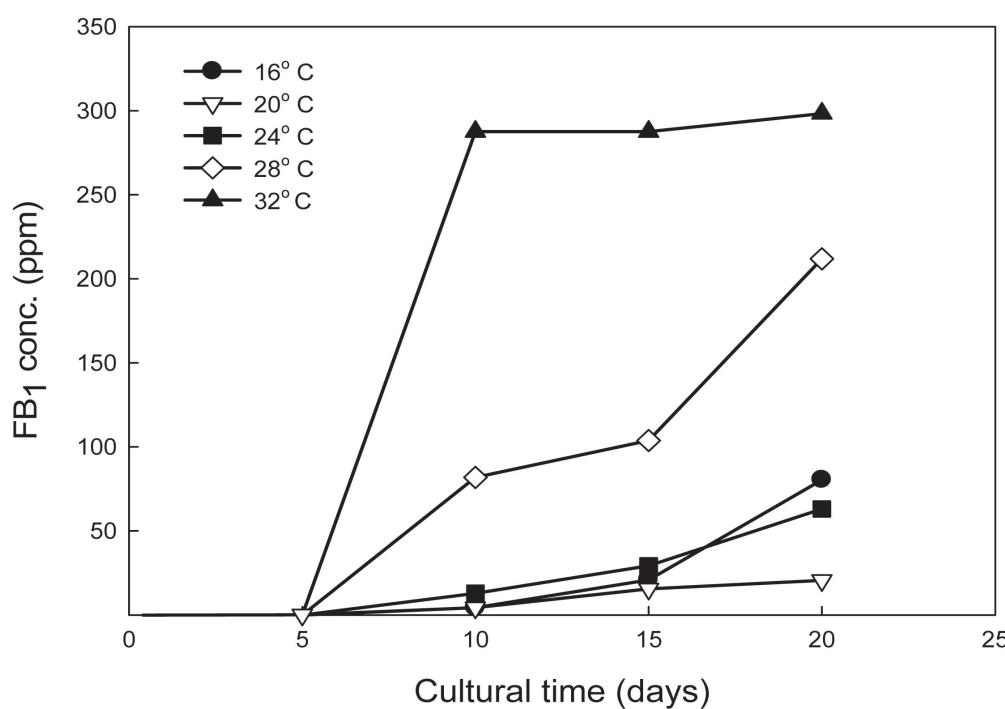
圖四、市售穀類含有伏馬镰孢毒素 B₁ 的調查 (PG：紫糯米，RI：白米，UR：糙米，MI：小米，CO：玉米，OA：燕麥，NB：裸麥，WH：小麥及 BW：蕎麥)。

Fig. 4. Survey of fumonisin B₁ existed in cereals obtained from market. (PG: purple glutinous rice, RI : rice, UR: unpolished rice, MI: millet, CO: corn, OA: oat, NB: naked barley, WH: wheat, and BW: buckwheat)



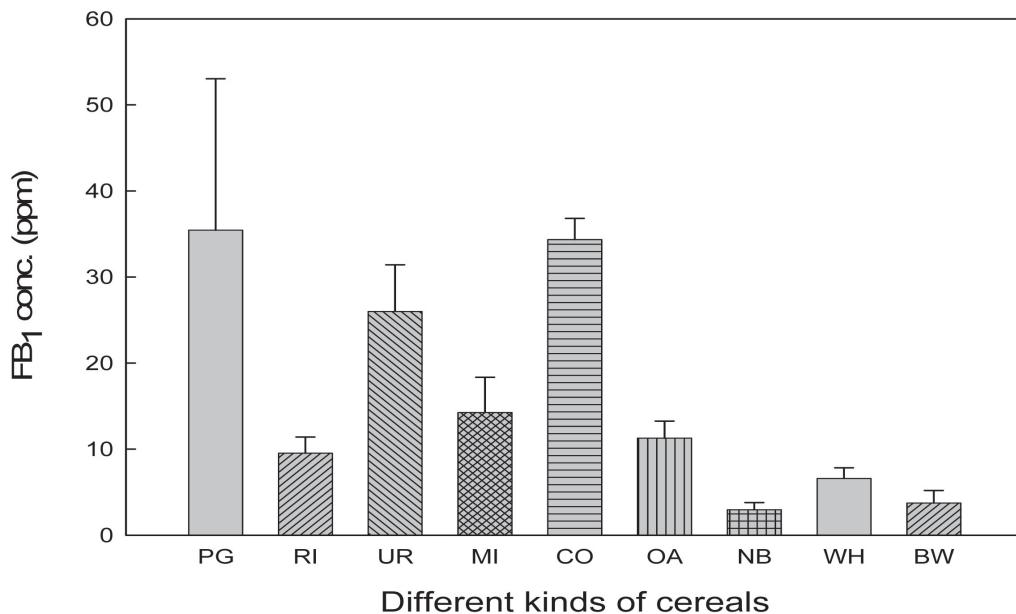
圖五、市售飼料污染伏馬鎌孢毒素 B₁ 之調查。(Pfa-M：中豬飼料，Pfa-L：大豬飼料，Sf：母豬飼料，Bf：公豬飼料，Cff：肉雞飼料，AF-e：鰻魚飼料，AF-mf：虱目魚飼料，AF-p：鱸魚飼料)

Fig. 5. Survey of feeds contaminated with fumonisin B₁ obtained from market. (Pfa-M: pig fattening meal-Medium, Pfa-L: pig fattening meal-Large, Sf: sow feed, Bf: boar feed, Cff: chicken fattening feed, AF-e: aquaculture feed-eel, AF-mf: aquaculture feed-milk fish, AF-p: aquaculture feed-perch). Note: Fumonisin B₁ analyzed by high-performance liquid chromatography.



圖六、在五種溫度下以玉米粉液態培養基靜置培養 *Fusarium proliferatum* ST-P01 不同天數後產生伏馬鎌孢毒素 B₁ 之情形。

Fig. 6. Fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* isolate ST-P01 cultured statically in liquid corn meal medium for different days at five temperatures.



圖七、不同穀類培養 *Fusarium proliferatum* ST-P01，經過 10 天後產生伏馬鎌孢毒素 B₁ 的比較 (PG：紫糯米，RI：白米，UR：糙米，MI：小米，CO：玉米，OA：燕麥，NB：裸麥，WH：小麥，BW：蕎麥)。

Fig. 7. Fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* isolate ST-P01 cultured in various liquid cereal meal media for 10 days. (PG: purple glutinous rice, UH: unpolished rice, RI : rice, MI: millet, WH : wheat, CO: corn, OA: oat, NB: naked barley, and BW: buckwheat)

培養基基質種類對供試菌株產毒的影響：各種不同穀類基質在接種 ST-P01 菌株後，皆有菌絲纏據及基質出現變色的情形，經過毒素分析結果如圖七所示，各基質皆檢測有 FB₁ 毒素存在，其中以紫糯米、玉米及糙米等三種穀類作為培養基所偵測到的 FB₁ 毒素含量最高，分別為 35.43、34.35 及 25.99 ppm。

討 論

精確偵測真菌毒素的首要工作即為確立良好的萃取條件，本研究利用衛生署公告⁽⁸⁾之萃取條件萃取伏馬鎌孢毒素，測得固態樣品與液態樣品之回收率介於 95-111% (表一)。回收率大於 100%，可能與試驗所添加之玉米粒含有伏馬鎌孢毒素有關。作物儲藏性病害通常在田間收穫前已遭受病原菌感染或污染，一旦儲藏環境欠佳時病原菌族群即大量增加，繼而產生大量的二次代謝物；設若人或畜養動物食用受污染的穀類後，極易造成健康上的問題，嚴重者甚至死亡。一般熟知的儲藏性真菌二次代謝物有黃麴毒素及伏馬鎌孢毒素等，研究學者指出會產生本毒素之真菌除鎌孢菌屬的真菌外，尚有 *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* 亦會產生。Thiel⁽²¹⁾ 等人指出會大量產生伏馬鎌孢毒素之鎌孢菌屬真菌大多屬 Liseola section，包括 *F. moniliforme*、*F. proliferatum* 及 *F. subglutinans* 三種，而其中

僅 *F. subglutinans* 不會產生伏馬鎌孢毒素。本研究挑選 Liseola section 真菌作產毒能力調查，結果如表二，會產生 FB₁ 毒素的真菌皆為 *F. proliferatum*，至於 SR-35、SR-45 及 SR-135 菌株屬於 *F. subglutinans* 皆沒有產生 FB₁ 毒素。

本研究針對市售穀類含 FB₁ 毒素進行檢測，發現九種受檢測穀類中，糙米含 FB₁ 毒素有 4 ppm、紫糯米含 0.1 ppm，其餘七種穀類則均未偵測到 FB₁ 毒素的存在 (圖六)，推測此結果與鎌孢菌的寄主種類及其侵入感染的位置有關。由於擁有產生 FB₁ 毒素能力的菌株需要利用澱粉才可代謝成 FB₁ 毒素⁽²⁾，故含有較高量澱粉之穀類一旦遭受病原菌污染後，有較高的機率可偵測到 FB₁ 毒素的存在。若以 *F. proliferatum* 為例，其侵染玉米的主要部位是耳穗 (ear)⁽¹³⁾；至於稻穀方面則偶而會侵入達胚的部位，故稻穀經過不同的加工流程所製成之各種成品，會含有不一樣濃度的 FB₁ 毒素，例如糙米僅除去米糠部分，菌若已完成侵入感染，則菌可能存於糙米胚中，並可偵測到 FB₁ 毒素的存在。其他穀類亦可能在脫殼過程已除去病原菌，故無法偵測到 FB₁ 毒素的存在。顯然，設若穀類在收穫時遭受到真菌的污染，吾人可採用精製加工法去除病原菌，即可得到清潔安全的穀物。

逢機針對豬、雞及水產飼料等共八種飼料進行抽樣，並偵測有無 FB₁ 毒素存在，結果發現公豬飼料中檢

測到 FB₁ 毒素的含量最高，達 1.27 ppm；至於水產鰐魚飼料中 FB₁ 的毒素含量則最低，為 0.07 ppm。一般豬飼料成份中玉米佔 50% 以上，雞飼料中玉米約佔 30%，水產飼料以玉米蛋白粉佔 20% 左右。根據結果顯示含 FB₁ 高量者大部份屬於豬飼料，其次為雞飼料，此結果與飼料中含有玉米的量有著密切的相關性，因此推測最適產 FB₁ 毒素的基質為玉米。

為了要防止 FB₁ 毒素在穀類中出現，有效的方法就是在穀物生育過程避免病原菌的感染與族群的建立，才能確保收穫的穀類清潔健康，若收穫後遭到病原菌汙染，則需要有效調控儲藏條件，以扼止病原菌持續感染。往昔 Marine 等人⁽¹²⁾ 指出 *F. proliferatum* 之最適生長溫度介於 28 至 32°C 間。本研究發現在 16 至 32°C 間培養 *F. proliferatum* ST-P01 菌株 5 天後，其中以 28 至 32°C 間培養之基質可以偵測到 FB₁ 毒素的產生；培養 10 天後，FB₁ 毒素的產量即有明顯的增加。惟於 28°C 以下或 32°C 以上的溫度培養，儘管培養超過 20 天，FB₁ 毒素產量仍然相當低。是故調控穀物的儲藏溫度，可有效控管 FB₁ 毒素的產生與累積。

利用不同種穀類作為產毒培養基試驗，發現以紫糯米及玉米為培養基之產毒量最高，然而以紫糯米做為培養基質之重複間數據差異頗大，其結果之信賴度易遭質疑；至於以玉米做為培養基質之結果，重複間差異較小，顯示以玉米培養 *F. proliferatum* ST-P01 菌株之產毒量高且穩定，此結果恰與 Castellá 等人⁽⁴⁾ 的研究成果相仿。追溯本項研究結果的可能關連因子在於 ST-P01 菌株係分離自含有大宗玉米成分之大豬飼料，故將其培養於玉米基質中可以產生較穩定量的 FB₁ 毒素。

謝 辭

本研究部份工作承蒙 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局計劃〔99 農科 -9.2.2- 檢 -B3 (1)〕經費資助完成，特此致謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G., and Vleggaar, R. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 11: 743-745.
- Bluhm, B. H. and Woloshuk, C. P. 2005. Amylopectin induces Fumonisin B₁ production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. Mol. Plant Microb. Int. 18: 1333-1339.
- Butler, T. 1902. Notes on a feeding experiment to produce leucoencephalitis in a horse with positive results. Am. Vet. Rev. 26: 748-751.
- Castellá, G., Bragulat, M. R., and Cabañes, E. J. 1999. Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. J. Agric. Food Chem. 47: 4707-4710.
- Cerrillo, G. N., Rodriguez, F. S., Gordo, L. G., de Mendoza-Salcedo, M. H., and Cordero, V. R. 1996. Clinical and pathological aspects of an outbreak of equine leucoencephalomalacia in Spain. J. Vet. Med. A 43: 467-72.
- Chatterjee, D., Mukherjee, S. K., and Dey, A. 1995. Nuclear disintegration in chicken peritoneal macrophages exposed to fumonisin B₁ from Indian maize. Lett. Appl. Microbiol. 20: 184-185.
- Chen, J., Mirocha, C. J., Xie, W., Hogge, L., and Olson, D. 1992. Production of mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternate* f. sp. *lycopersici*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3928-3931.
- Department of Health, Executive Yuan, R.O.C. 2004. Method of test for mycotoxin in foods-Test of Fumonisin B₁ and B₂ in corn and corn products. Notice of Department of Health, Executive Yuan, R.O.C. Notice No. 0939316919.
- Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vleggarr, R., and Kriek, N. P. J. 1988. Fumonisins- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1806-1811.
- Gumprecht, L. A., Beasley, V. R., Weigel, R. M., Parker, H. M., Tumbleson, M. E., Bacon, C. W., Meredith, F. I., and Haschek, W. M. 1998. Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. Toxicol. Pathol. 26: 777-788.
- Marasas, W. F. O., Kellerman, T. S., Gelderblom, W. C. A., Coetzer, J. A. W., Thiel, P. G., and Van der Lugt, J. J. 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Res. 55: 197-203.
- Marin, S., Sanchis, V., Vinas, I., Canela, R., and Magan, N. 1995. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. App. Microbiol. 21: 298-301.
- Munkvold, G. P. and Desjardins, A. E. 1997. Fumonisins in maize. Can we reduce their occurrence? Plant Dis. 81: 556-565.
- Nash, S. M. and Snyder, W. C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. Phytopathology 52: 567-572.

15. O'Donnell, K. 1993. Fusarium and its near relatives. Pages 225–233 in: The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. D. R. Reynolds & J. W. Taylor (eds). CAB International, Wallingford, 375 pp.
16. Raoofi, A., Mardjanmehr, S. H., Khosravi, A. R., Kojouri, G. A., Lotfollahzaheh, S., Nekoie, S., and Jafarian, M. 2003. Equine leukoencephalomalacia in Iran. J. Eq. Vet. Sci. 23: 469-70.
17. Rheeder, J. P., Walter, F. O., and Vismer, H. F. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2101-2105.
18. Rosiles, M. R., Bautista, J., Fuentes, V. O., and Ross, F. 1998. An outbreak of equine leukoencephalomalacia at oaxaca, mexico, associated with fumonisin B₁. J. Vet. Med. 45: 299-302.
19. Ross, P. F., Rice, L. G., Reagor, J. C., Osweiler, G. D., Wilson, T. M., Nelson, H. A., Owens, D. L., Plattner, R. D., Harlin, K. A., Richard, J. L., Colvin, B. M., and Banton, M. I. 1991. Fumonisin B₁ concentrations in feeds from 45 confirmed equine leucoencephalomalacia cases. J. Vet. Diagn. Invest. 3: 238-41.
20. Sydenham, E. W., Marasas, W. F. O., Shephard, G. S., Thiel, P. G., and Hirooka, E. Y. 1992. Fumonisin con-
- centration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. J. Agric. Food Chem. 40: 994-997.
21. Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Sydenham, E. W., Shephard, G. S., Geldweblom, W. C., and Niewenhuis, J. J. 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1089-1093.
22. Thiel, P. G., Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Marasas, W. F. O., Nelson, P. E., and Wilson, T. M. 1991. Levels of fumonisin B₁ and B₂ in feeds associated with confirmed cases of equine leucoencephalomalacia. J. Agric. Food Chem. 39: 109-11.
23. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). Academic Press, San Diego, 482 pp.
24. Wilson, T. M., Ross, P. F., Rice, L. G., Osweiler, G. D., Nelson, H. A., Owens, D. L., Plattner, R. D., Reggiardo, C., Noon, T. H., and Pickrell, J. W. 1990. Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leucoencephalomalacia. J. Vet. Diagn. Invest. 2: 213-21.

ABSTRACT

Lin, S. R.¹, Deng, T. S.², Lin T. C.¹, Fan, Y. K.³, and Huang J. W.^{1,4} 2010. Identification for *Fusarium* species producing fumonisin B₁ and factors affecting the mycotoxin production. Plant Pathol. Bull. 19: 191-200. (¹ Department of Plant Pathology; ² Department of Agronomy; ³ Department of Animal Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.; ⁴ Corresponding author, E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw; Fax: +886-4-2285-1676)

The fumonisin B₁ (FB₁) production ability of 16 *Fusarium* isolates in the section Liseola obtained from rice and corn by Nash-PCNB selective medium was examined and evaluated by using Fumonisin kit and HPLC. Four isolates, ST-P01, PR-14, PR-44, and PR-143 were found able to produce FB₁ and subsequently identified as *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg based on conidial morphology, conidigenous cell, and ribosomal DNA (rDNA) LSU-D1/D2 domain sequencing of these isolates. Among the four isolates, a highest amount of FB₁ production, up to 518.52 ppm, was obtained from isolate ST-P01. In advance, the factors affecting FB₁ production were studied. The FB₁ production by isolate ST-P01 could be detected five days after its static culturing, and the highest production of FB₁ was at 32°C compared to the other temperature treatments. Isolate ST-P01 produced the highest amount of FB₁ up to 35.43 ppm in purple glutinous rice meal liquid medium among nine substrates, including purple glutinous rice, unpolished rice, rice, millet, wheat, corn, oat, naked barley, and buckwheat. Isolate ST-P01 cultured in corn meal liquid medium could produce 34.35 ppm of FB₁. However, the less one was at 2.96 ppm when isolate ST-P01 was cultured in naked barley meal liquid medium.

Keywords: fumonisin B₁, Genus *Fusarium*, *Fusarium proliferatum*, cultural factors, mycotoxin