

玉米赤霉烯酮的研究

李季伦 朱彤霞 张旻*

(植物保护及微生物学系)

李宝仁 邓泽沛 李永生

(兽医系)

孟繁静

(农学系)

提 要

自京郊分离的玉米赤霉菌 (*Fusarium roseum graminearum*) BAU-z 8 菌系的培养物 (大米培养基) 中提出了一种具有动物雌性激素作用的物质。根据其熔点、紫外和红外光谱等理化性质, 被鉴定为玉米赤霉烯酮 (zearalenone)。一公斤大米制备的培养基经接种发酵后, 可提出1.4克的玉米赤霉烯酮结晶。本文报导了玉米赤霉菌的选育和培养, 玉米赤霉烯酮的提取、纯化的方法, 以及有关玉米赤霉烯酮的生物学效应的研究。

试验表明, 玉米赤霉烯酮可显著刺激小白鼠子宫增重和促进北京鸭生长。幼令小白鼠经用玉米赤霉烯酮油剂皮下注射, 三天后剖检, 其子宫鲜重可达对照者4—5倍, 甚至7倍。北京鸭于填鸭开始时, 每日口服含0.7mg玉米赤霉烯酮胶囊, 10天内其平均体重比对照者增约16.5% ($P < 0.01$) 未发现副作用。

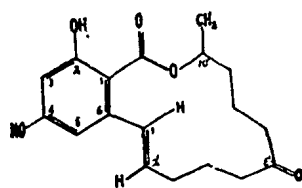
值得注意的是, 我们发现已渡过春化的冬小麦生长锥中也存在类似玉米赤霉烯酮的物质, 其生长锥的乙酸乙酯抽提液经薄板层析后, 在硅胶薄板层析谱上有和玉米赤霉烯酮相同 R_f 值的兰荧光斑点, 并可被 $FeCl_3$ 显紫红色。可是经含100ppm玉米赤霉烯酮的 $NaHCO_3$ 水溶液浸种处理的冬小麦, 于常温、长光照下分别播种于温室和田间后, 仅观察到生长锥分化到二棱期, 未见抽穗。看来玉米赤霉烯酮尚不能完全代替低温春化作用。另一方面, 经浸种处理的墨西哥春小麦 (Potam 品种), 在春季田间播种后, 不但生长良好, 而且比对照提前抽穗5天左右。关于玉米赤霉烯酮对小麦生长发育的效应的研究仍在进行中。

※ ※ ※ ※

* 李秀玉同志参加过菌种分离工作

玉米赤霉烯酮 (Zearalenone) 又称 F—2, 它是玉米赤霉菌 [*Gibberella zeae*, 其无性世代为禾谷玫瑰镰刀菌 (*Fusarium roseum* 'graminearum')] 的一种代谢产物。

Stob 等 (1) 于 1962 年首先自玉米赤霉菌的培养物中分离出这种物质, 证实它是猪吃发霉玉米后引起阴门膨大甚至外翻和乳房隆起的病因。此物质具有动物雌性激素的作用, 可显著地刺激小白鼠子宫生长, 并可促进肉用牛、羊增重和提高饲料利用率, 而无可觉察的副作用。为此, Andrew 和 Stob (2) 于 1965 年曾申请美国专利。同年, Christensen 等 (3) 也报导了从玉米赤霉菌的培养物中分离出此物质, 命名为 F—2。1966 年 Urry 等 (4) 确定了此物质的化学结构, 属于二羟基苯酸内酯类化合物, 命名为玉米赤霉烯酮 (Zearalenone) (图 1)。此后, Mirocha 等和 Caldwell 等人比较系统地研究了它的理化性质和生物效应 (5、6、7、8), 他们发现 F—2 不仅具有动物雌性激素的作用, 而且也能促进某些真菌形成子实体, 因此被认为是真菌的一种性激素 (9、10、11、12)。



玉米赤霉烯酮结构式

图 1 玉米赤霉烯酮结构式

此外, 还发现低浓度 ($0.02-1.0 \mu\text{mol/l}$) 的 F—2 能刺激烟草愈伤组织生长和形成枝条 (7)。

近年来, 玉米赤霉烯酮的研究逐渐引起人们的重视。据英国《世界作物》(27卷第 6 期第 283 页) 1975 年报导, 英国一肉用牛场用一定剂量的玉米赤霉醇 (玉米赤霉烯酮的还原产物, 其生物效应比烯酮大 3 倍) 弹丸, 埋入牛耳基皮下, 日增重比对照者高达 43.5%。目前, 美国、墨西哥、西班牙、法国、澳大利亚等 20 多个国家都正在进行较大规模的试验。美国商业溶剂公司 (CSC) 已开始大量生产玉米赤霉醇作为肉用牛、羊生长促进剂、商品称为 Ralgro。

我们从 1973 年开始此项研究工作。在菌种选育、培养和玉米赤霉烯酮的分离提纯、理化鉴定和生物效应等方面进行了研究。本文是此项研究工作的总结。

材 料 和 方 法

菌种: 1973 年自京郊患赤霉病的玉米粒中分离出玉米赤霉菌, 编号为 BAU—z8。

培养基: 分离菌种用马铃薯—蔗糖—洋菜培养基; 培养菌种用察氏 (Czapek) 培养基; 长期保存菌种用石蜡油封藏。玉米赤霉烯酮生物合成采用大米或玉米渣固体培养基。于 250 ml 三角瓶中装入大米 (或玉米渣) 50 克, 再加大米 (或玉米渣) 干重的 50% 水, 充分摇匀, 浸湿后, 于 1.1 kg 高压灭菌 40 分钟。

培养温度: 菌种在 26℃ 下培养 4—5 天, 待菌丝布满培养基时, 切割成 1 cm² 大小的菌丝块 (连同洋菜培养基), 接种到大米 (或玉米渣) 培养基中, 每三角瓶接种一块。于 26℃ 下培养 2 周后, 转入 4—8℃ 低温下 2 周, 再转回 26℃ 继续培养 10 天或 2 周。

玉米赤霉烯酮的提纯: 采用乙酸乙酯直接自发酵物中抽提并结合硅胶柱层析分离, 然后用沉淀法制备纯结晶, 详细步骤见结果项下。柱层析硅胶 100—120 目 (上海产)。所用化学试剂除乙酸乙酯为化学纯外, 其它均为分析纯。

理化鉴定:

熔点测定: 用毛细管法。

紫外吸收光谱: 用 Carl Zeiss Jena 厂出品的 UV Vis 分光光度计扫描。

红外吸收光谱: 用 Carl Zeiss Jena 厂出品的 UR 10 红外分光光度计测定 (KBr 片)。

硅胶薄层分析: 薄板层析用硅胶 G, 为青岛产品。硅胶板 $6 \times 25\text{cm}$, 硅胶厚 0.5mm , 推动剂为石油醚 ($60-90^\circ\text{C}$) 和乙酸乙酯混合液 ($60:40, \text{v/v}$)。

用波长 254nm 的紫外光分析仪测荧光斑点, 以 $5\% \text{FeCl}_3$ 水溶液喷雾后加热显色。薄板层析法作半定量分析时, 硅胶厚度、点样大小和点样量要求一致。绘制不同量 (自 $10\mu\text{g}$ 到 $100\mu\text{g}$) 的标准纯品的层析荧光斑或 FeCl_3 显色斑作参考, 与未知样品的斑点进行比较, 加以估计。这种方法不够精确, 往往偏低。在每次分析未知样品时, 必须用标准品 (一般是 $30\mu\text{g}$) 作对照。

定量分析采用 Mirocha (5) 方法。将硅胶板上的样品荧光斑刮下, 用无水乙醇溶出, 离心去硅胶, 用 Unicum SP500 紫外分光光度计在 254nm 波长下测吸收值。玉米赤霉烯酮在 $3-10\mu\text{g}$ 间, 其光密度与量成直线关系, 可作为定量分析的标准曲线。

生物效应:

小白鼠子宫增重试验: 选用体重 $12-15\text{g}$ 的雌鼠。腹部皮下注射含一定量的玉米赤霉烯酮油剂 (先以微量无水乙醇溶解赤霉烯酮, 再以灭菌植物油稀释至所需要的浓度)。每日注射 2 次 (间隔 12h), 每次注射 0.1ml 。对照只注射等量的灭菌植物油。第 4 天剖检, 取出子宫, 去掉卵巢并挤出子宫内分泌物, 称鲜重。

北京鸭增重试验: 选用 3.5斤 左右的北京鸭, 于填鸭开始时, 口服含一定量玉米赤霉烯酮的胶囊丸。先将胶囊装满淀粉, 然后定量加入玉米赤霉烯酮的无水乙醇溶液, 待乙醇挥发后加盖备用。每组处理选用公鸭和母鸭各 20 只以上。试验开始时分别称重, 试验结束时再称重, 并取样进行解剖, 观察有无异常变化。

影响小麦发育试验: 试验用春小麦为墨西哥 ‘波他姆 (Potam)’ 品种; 冬小麦为 1230、农大 139 和 1817, 它们的冬性程度按以上顺序加深。处理采用浸种法。将小麦种子经升汞水表面消毒后, 浸入含有一定量的玉米赤霉烯酮的 0.5% 碳酸氢钠水溶液中 (为促进玉米赤霉烯酮溶解, 先以微量无水乙醇将赤霉烯酮溶解后, 再用 0.5% 碳酸氢钠水溶液稀释到所需要的浓度)。在 20°C 左右温度下浸泡 24 或 48 小时, 至种子露白为止, 随即播种花盆内或田间, 观察其生长和发育情况。

冬小麦人工春化在 2°C 冰箱中进行, 1230, 40 天; 农大 139, 50 天; 1817, 60 天。剥取已渡过春化的小麦生长锥 150 粒, 浸泡在少量乙酸乙酯中过夜, 然后点样进行薄板层析, 检测有无类似玉米赤霉烯酮的物质产生 (根据荧光斑点的 R_f 值和 FeCl_3 显色反应)。以标准品作对照。

田间生长的冬小麦于出苗后, 定期取样, 剥取生长锥, 照上述方法进行分析。

结 果 与 分 析

菌种选育

1973年自京郊患玉米病的不同品种的玉米病粒中分离玉米赤霉菌，自黄玉米病粒中分离得BAU—z 8菌株，自白玉米病粒中得BAU—z 10菌株。z 10菌株产生玉米赤霉烯酮的能力比z 8为低，而且产色素多，因此选用z 8菌系。此菌在察氏培养基上，菌丝生长茂盛，白色，不产生小孢子，很少产生或不产生大孢子。大孢子呈新月形， $32.5-52.8 \times 4.5-5.0 \mu$ ，多为3—5隔，未见有子囊壳形成。生长后期基内菌丝产生紫红色素。

z 8菌系很容易自然分离出两型菌落，一型生长快，菌丝疏松，我们称之为F型；另一型生产较慢，菌丝致密，称为S型（图2）。这两型菌系的玉米赤霉烯酮的产量与亲本型相比，差异不大（表1）。

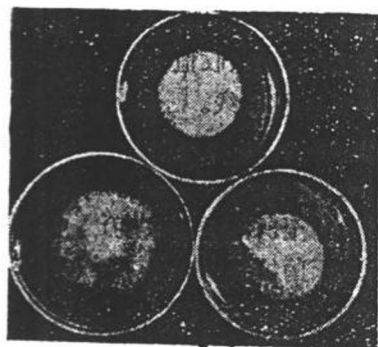


图2 玉米赤霉菌
BAU—z 8亲本型(下右)及
其F型(下左)和S型(上)的
菌落。

玉米赤霉菌在察氏培养基上经几次转代就会丧失合成玉米赤霉烯酮的能力。Bacon等(13)最近也报导了类似情况。但保藏在石蜡油中的菌种性状稳定，6年多尚未见丧失活性的现象。接种用的菌种，每次由石蜡油中移出，经活化培养后接种。

我们曾试用紫外光照射菌丝生长尖端的方法，进行诱变选种，未获得满意结果。

玉米赤霉烯酮的生物合成

我们以大米作为发酵培养基，接种BAU—z 8菌系后，先在 26°C 下培养2周，使菌获得充分生长，然后转入低温（ $4-8^{\circ}\text{C}$ ）下保持2周，再转回 26°C 继续培养10天至2周。在这种条件下，每公斤大米原料经发酵

表1. BAU—z 8及其F型和S型的生长速度和赤霉烯酮产量的比较

菌 系	生 长 速 度 (直径mm) Δ		玉米赤霉烯酮产量* mg/kg大米
	24小时	48小时	
BAU- z 8	20.5	50.0	1900
BAU- z 8-S	20.5	47.5	1600
BAU- z 8-F	29.5	61.5	1700

Δ 察氏培养基，培养温度 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，

* 两次试验平均值，系根据薄板层析作半定量估计。

后可产生4500mg左右的玉米赤霉烯酮（紫外分光光度计定量测定）。发酵良好的培养物呈

紫褐色，有氨味，pH 可上升到 8 以上。如前期生长的温度超过 30℃，则玉米赤霉菌会进行酒精发酵，培养基变酸，玉米赤霉烯酮的产量很低，甚至不产生。以玉米液作发酵培养基获得相似结果。

玉米赤霉烯酮的生物合成是否必须经过低温阶段，文献中报导不一。Stob 等 (1) 最初是从在 24℃ 下生长 2—3 周后的玉米赤霉菌中提取出玉米赤霉烯酮的。Bacon 等 (13) 用液体培养基在 24—28℃ 下静止培养，也证明可以产生少量玉米赤霉烯酮。但我们在 25—27℃ 下用大米或玉米渣培养基连续培养 4、5、6 周均尚未见有玉米赤霉烯酮产生，这与 Mirocha 等 (5) 报导的一致。所以造成以上各实验结果上的差异，可能是因为所用菌系的特性不同所致。在玉米赤霉菌中似乎也因适应不同环境而有冬性春性之分。

在 70 年代初，研究玉米赤霉烯酮生物合成的培养基主要是限于用各种谷物所制备的固体培养基。虽曾试用液体培养基，但不产生玉米赤霉烯酮。Bacon (13) 于 1977 年报导，用淀粉—谷氨酸—酵母汁培养液作培养基培养玉米赤霉菌，当培养液与培养容器的体积比适合时，于静止条件下可产生玉米赤霉烯酮，但产量低，只有 80mg/l。而用摇床振荡培养时，不形成玉米赤霉烯酮。最近美国商业溶剂公司 (CSC) 以 Hidy 为首的研究组 (14) 公开了他们过去的专利。指出在选用适合的突变菌株和高糖 (30%) 培养液，于 24℃ 下进行深层发酵，14—20 天可获得 32g/l 的玉米赤霉烯酮，为大生产奠定了基础。此外，他们用珍珠砂作支持物，加入高糖量培养液进行固体发酵，于 16—17℃ 下培养 4—5 周，也可获得 30g/l 的产量。

在玉米赤霉烯酮的生产方面，我们还有待进一步研究提高。

玉米赤霉烯酮的提纯及其理化分析

Stob 等 (1) 最初是用无水乙醇提取玉米发酵物，经浓缩后，进行硅胶柱层析，然后用逐渐增加极性的溶剂，逐级洗脱，分出有活性的部分，浓缩后得到白色结晶。Mirocha 等 (5) 用二氯甲烷在索氏提取器中抽提发酵物，经适当浓缩后再转移到乙腈中。将乙腈抽提液浓缩至干，再以少量氯仿溶解，然后上硅胶柱。以石油醚洗去色素等杂质，再以大量二氯甲烷洗脱。收集有活性部分，经浓缩后，用逆流分泳法分离。溶剂系统上相为甲醇 (3) 和乙醚 (5)，下相为石油醚 (2) 和水 (1)。收集含玉米赤霉烯酮部分，浓缩至干，以氯仿溶解，滴加石油醚 (60—90℃) 至混浊，置冰箱中，使结晶析出。如结晶有颜色，需反复重结晶几次。Caldwell 等 (6) 用无水乙醇直接抽提发酵物，乙醇抽提液浓缩后，用乙醚抽提。再用 0.25% NaOH 抽提乙醚液，调碱抽提液 pH 至 3.5，再转入乙醚中，浓缩至干，溶于甲醇中进行薄层分析。未介绍制备结晶的方法。以上诸人的报导，均未涉及玉米赤霉烯酮的提取收率。Andrew 和 Stob (2) 的专利报导中所采用的提炼方法也比较复杂。先用乙醇提取发酵物，乙醇抽提液浓缩至干，再以氯仿溶解。以 5% Na₂CO₃ (pH 11—12) 分多次抽提氯仿液。调碱提取液 pH 至 6.2，可析出固体不纯物。以乙醚溶解固体物，弃去不溶部分，将乙醚液浓缩至干，可得黄色粉末，即可直接用以喂饲动物。如要得到纯品，则进一步用逆流分泳法提纯。他们采用上述步骤，于 300 g 干发酵物中获得 59mg 玉米赤霉烯酮结晶。

我们参照他人的方法，结合现有试验条件，采用以下提取法。

将培养物用原大米干重 2.5 倍的乙酸乙酯，分 5 次抽提。抽提液浓缩至原体积的 1/10，用 5% NaOH 提取 7 次 (NaOH 总用量为乙酸乙酯浓缩液的 2 倍)。碱提取液用 H₃PO₄ 调至

pH 6, 再以乙酸乙酯提取 2 次 (总用量为碱液的一半)。乙酸乙酯提取液经无水硫酸钠脱水, 活性炭脱色, 过滤后, 减压浓缩到 20ml 左右, 然后用活化的硅胶吸附浓缩液, 待阴干后, 磨成粉状, 直接上硅胶柱。已活化的硅胶装柱前悬浮在石油醚 (60—90℃) 和乙酸乙酯混合液 (6 : 4 v/v) 中。如吸附浓缩液的硅胶用量大时, 则应分几次上硅胶柱, 其上柱量不要超过硅胶柱长度的 1/3。然后用石油醚 (60—90℃) 和乙酸乙酯混合液 (6 : 1) 洗脱。分级收集洗脱液, 每管收集 10 ml。以滤纸片沾收集液, 在紫外光下检查。如洗脱液中有玉米赤霉烯酮, 滤纸片在紫外光下出现蓝色荧光斑。合并有荧光的洗脱液 (略带淡黄色), 适当浓缩后, 滴加石油醚 (60—90℃) 至混浊, 置冰箱中析出结晶。结晶再溶于乙酸乙酯或氯仿中, 滴加石油醚 (30—60℃) 进行重结晶, 即得成品。这种成品再经硅胶薄板层析分离, 制备成纯结晶, 作为标准样品。

用这种方法, 提取率可达 50% 左右。1 kg 大米作成培养基, 经发酵后可提出 1.4 g 左右的玉米赤霉烯酮结晶。

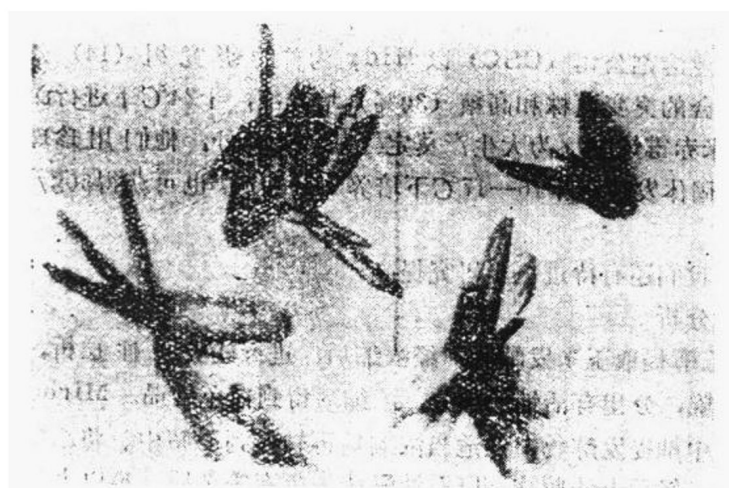


图 3 玉米赤霉烯酮结晶

玉米赤霉烯酮结晶呈白色, 在显微镜下为簇针状 (图 3)。熔点 161—163℃。紫外和红外吸收光谱 (图 4, 图 5) 与 Mirocha (5) 报导的一致。硅胶薄板层析 R_f 值为 0.5, 在 254nm 紫外光下呈现亮蓝色荧光。经 $FeCl_3$ 水溶液喷射后, 呈现紫红色斑点, 加热可促进显色。

生物效应

1. 小白鼠子宫增重 玉米赤霉烯酮可明显地刺激幼令小白鼠的子宫生长 (图 6, 图 7)。

经多次试验, 发现试验动物的体

重以 12—15 g 为宜, 体重超过 16g 的小白鼠可能有内源激素的干扰, 不宜作试验材料。以油剂每日 2 次注射效果最好。

玉米赤霉烯酮的剂量在 15 μ g—480 μ g 范围内, 子宫增重随浓度增加而增加 (表 2, 图 8) 当剂量在 480—960 μ g 时, 子宫增重最明显, 子宫鲜重可相当于对照的 4—5 倍, 最高达 7 倍。剂量大于 1000 μ g 时, 增重幅度不大。

成年小白鼠摘除卵巢后, 以玉米赤霉烯酮处理的子宫鲜重比对照 (摘除卵巢, 但只注射植物油) 者也显著为高。例如经总剂量为 960 μ g 处理的子宫鲜重平均 (5 只) 为 289.5mg, 而对照的子宫鲜重平均 (5 只) 为 68.1mg, 相差 4—5 倍。由此说明, 玉米赤霉烯酮确有雌性激素的作用。

2. 北京鸭增重试验 据报导 (8), 玉米赤霉烯酮对禽类的增重效果不如牛、羊和猪。我们选用北京鸭作为试验材料, 一方面因为它的经济价值高, 另一方面, 北京填鸭是定时定量地强迫进食, 而且起始体重比较一致, 因而是比较理想的试验材料。

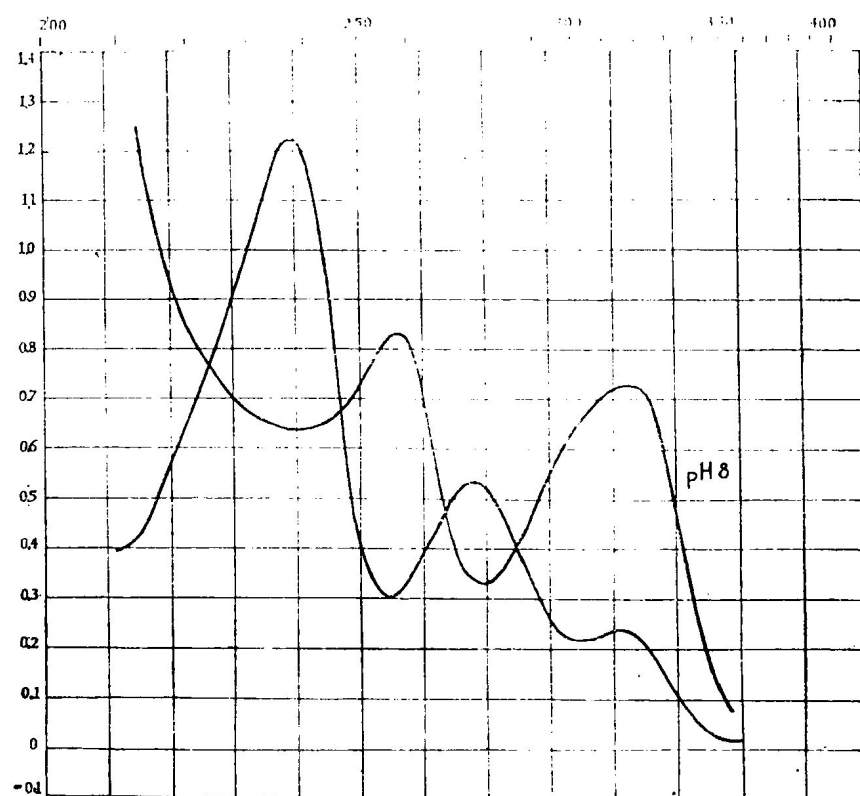


图4 玉米赤霉烯酮紫外吸收光谱（无水乙醇溶液）于236、274和316nm处有三个吸收峰，在pH 8时，吸收峰发生位移。



图6 小白鼠经玉米赤霉烯酮（960 μ g）处理后的子宫（4）与对照者（3）比较。



图7 小白鼠经玉米赤霉烯酮（480 μ g）处理后的子宫（右排）与对照者（左排）比较。

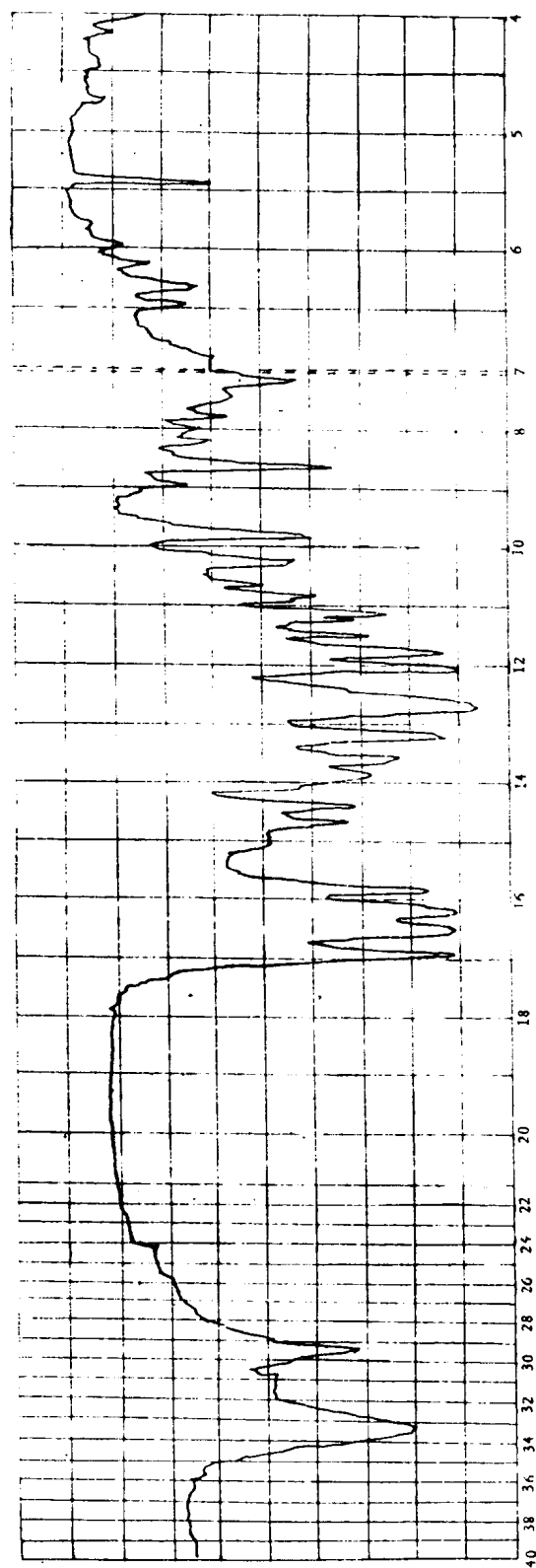


图 5 玉米赤霉烯酮红外吸收光谱 (KBr压片)

表2. 玉米赤霉烯酮对小白鼠
子宫增重效应

玉米赤霉 烯酮剂量 (μg)	鼠 数 (只)	平均每只 子宫鲜重 (mg)	比 对 照 增 重 (%)
0	6	15.8	—
15	5	17.2	8.8
30	6	20.3	28.5
60	6	28.0	77.2
120	5	35.6	125.3
240	6	47.4	200.0
480	6	63.2	300.0

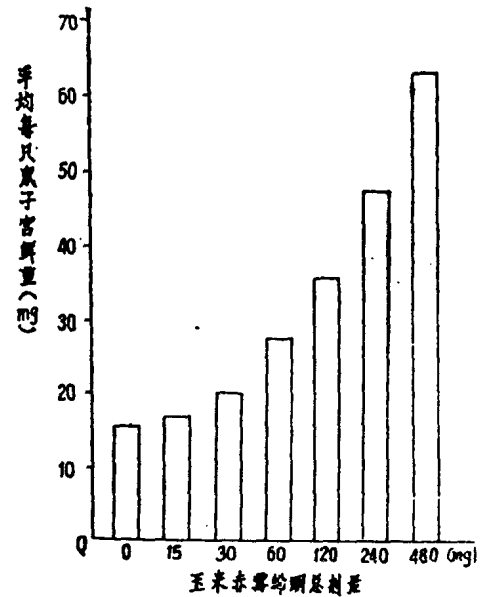


图8 不同剂量玉米赤霉
烯酮对小白鼠子宫增重效
应图解 (数据见表2)

我们先后进行了4次试验。第一次试验选用中鸭 (体重2.2斤左右), 以含玉米赤霉烯酮的油剂, 进行胸肌注射一次, 随大群饲养, 每周称重一次, 共称2次。注射2mg的第一周比对照增重22.4%, 到第2周时则下降到7%。第2次试验选用填鸭 (起始称重3.4斤左右), 经胸肌一次注射2mg的第1周比对照增重9.0%, 第2周增重只有0.5%; 注射4mg的第1周增重7.0%, 第2周已看不出有增重效果。由此看来, 玉米赤霉烯酮的增重效应维持不长, 因此, 第3、4批试验改为于填鸭开始时, 每日口服含一定剂量的胶囊丸, 日服2次。试验结果见表3和表4。经用生物统计分析, 增重效果显著。

表3. 玉米赤霉烯酮对北京填鸭增重效应 (1)

玉米赤霉烯酮 剂 量 (mg/只, 日)	鸭 性 别 和 数 目	初始平均 体 重 (斤)	10天后平 均体重 (斤)	平 均 增 重 (斤)	比对照 增 重 (斤)	增 重 百分数 (%)	P 值
0 (对照)	公 20 母 20	3.69 3.55	5.73 5.31	2.04 1.76	— —	— —	
0.35	公 20 母 20	3.68 3.45	5.89 5.42	2.21 1.97	0.17 0.21	8.3 11.9	<0.01 <0.01
0.70	公 20 母 20	3.68 3.48	6.01 5.58	2.33 2.10	0.29 0.34	14.2 19.3	<0.01 <0.01

表4. 玉米赤霉烯酮对北京填鸭增重效应 (2)

玉米赤霉烯酮 剂 量 (mg/只,日)	鸭 性 别 和 数 目	初始平均 体 重 (斤)	12天后平 均体重 (斤)	平 均 增 重 (斤)	比对照 增 重 (斤)	增 重 百分数 (%)	P 值
0 (对照)	公 21	3.62	5.56	1.94	/	/	
	母 21	3.55	5.19	1.64			
1.0	公 20	3.65	5.71	2.06	0.12	6.1	<0.05
	母 25	3.54	5.28	1.74	0.10	6.1	<0.05

由表3中看出:母鸭增重效果较公鸭明显,日服0.7mg者,公、母鸭平均比对照增重16.8% ($P < 0.01$);日服1mg者,增重幅度反而下降至6% (表4),这符合激素作用的规律。

在试验过程中,未发现异常现象。取样剖检也未见任何病变。

3. 对小麦生长发育的影响

玉米赤霉烯酮对高等植物生长发育的影响研究得很少。Mirocha (7) 曾引用 Tinsmerier-Bedner的资料,说明低浓度 ($0.02-1.0\mu\text{mol/l}$)的玉米赤霉烯酮水溶液可刺激烟草愈伤组织增重,并促使抽茎。除此之外,未见有其它报导。

根据玉米赤霉烯酮具有真菌的性激素作用,以及某些菌系需要经过低温条件才能进行生物合成玉米赤霉烯酮的特点,启发我们研究这种物质与冬性作物春化作用之间的关系。我们以小麦为对象,从两方面进行了探索:(1)分析春化后的冬小麦生长锥中是否含有类似玉米赤霉烯酮的物质,(2)用外源玉米赤霉烯酮处理(浸种)小麦种子,观察生长锥的变化,以及其在温室和田间生长发育的情况。

试验说明,冬小麦1230和农大139经人工低温春化后,生长锥中确含有与玉米赤霉烯酮相似的物质,其在硅胶层析板上荧光斑点的 R_f 值和对 FeCl_3 的显色反应均与玉米赤霉烯酮相同。在田间自然越冬的农大139和1817小麦中,定期取样,剥取生长锥进行薄层分析,发现也有类似的物质(表5)。

从表5中可以看出,农大139于1978年11月12日左右的样品中出现类似玉米赤霉烯酮的物质较多,荧光斑最亮。11月8日和11月17日的样品中荧光斑点微弱,12月7日以后则不显荧光。在每次取样分析的同时,自田间移苗至花盆中,于温室内在长光照下观察抽穗情况,发现在11月12日以前移苗的都未抽穗,而11月12日以后的都抽穗了,说明该品种在11月12日已完成了春化阶段。1979年采用1817深冬性品种作重复试验,也获得类似结果,但荧光斑点出现时间较晚,而是在11月29日最为明显。因某种原因未作平行移苗观察抽穗的试验。从这两次试验中可以看出,此物质确与冬小麦春化作用有关,它在一定时间才出现,而且以后又消失,转化为其它物质,处于动态变化之中。

另一方面,我们用不同浓度玉米赤霉烯酮的0.5% NaHCO_3 溶液(玉米赤霉烯酮不溶于水,溶于碱性溶液)浸种冬麦和春麦,至露白后,播种于温室和田间,观察小麦生长锥的分化和抽穗情况。我们发现,经100ppm玉米赤霉烯酮溶液处理的墨西哥春麦(Potam品种),

表5. 田间越冬小麦农大139和1817两个品种, 在不同时期, 其生长锥内类似玉米赤霉烯酮物质的分析及其与抽穗的相关性

农大139 (弱冬性)			1817 (深冬性)	
(1978年9月25日播种)			1979年9月25日播种	
田间取样时间	与玉米赤霉烯酮 R_f 相同的 萤光斑强度	移苗温室后 抽穗情况	田间取样时间	与玉米赤霉烯酮 R_f 相同的 萤光斑强度
10/12 日	-	×	11/6 日	-
11/2	-	×	11/16	+
11/8	+	△	11/29	+++
11/12	+++	✓	12/7	+
11/17	+	✓	12/21	-
11/21	+	✓		
11/27	-	✓		
12/7	-	✓		
12/13	-	✓		

在田间生长发育较水浸种和 NaHCO_3 浸种为好, 抽穗可提早5天左右, 且植株生长健壮, 抽穗整齐。冬麦农大139经处理后, 生长锥可进入二棱期(图9), 但在春播条件下和在温室长光照下均未见抽穗, 这可能是由于玉米赤霉烯酮并非小麦渡过春化所必需的唯一因素,

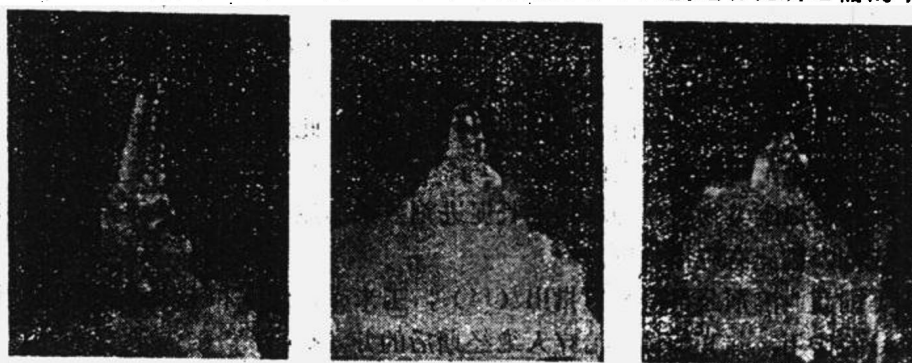


图9 玉米赤霉烯酮对冬麦(139)生长锥分化的促进作用。

(左) 100ppm玉米赤霉烯酮碳酸氢钠水溶液浸种,

(中) 0.5% NaHCO_3 溶液浸种,

(右) 水浸种。

或吸收量不足, 以及处理时期不当等原因所致, 这些问题有待进一步研究。

用含玉米赤霉烯酮的0.5% NaHCO_3 水溶液浸种, 不影响种子萌发, 但有抑制幼芽和幼根生长的作用。0.5% NaHCO_3 水溶液本身也有类似的作用, 含有玉米赤霉烯酮的则更甚, 但将浸过种的幼苗播种田间和温室花盆中, 能很快恢复正常。我们观察到0.5% NaHCO_3 浸种对生长锥分化也略有促进作用(图9)。

讨 论

玉米赤霉烯酮虽然具有动物雌性激素的类似效应，但它毕竟不是动物的天然雌性激素。无论在化学结构和生物效应上都和天然雌性激素有所不同。动物雌性激素为固醇类物质，其对子宫增重的效应，远比玉米赤霉烯酮的效应强得多，对小白鼠子宫有相同效果的剂量，两者相差近万倍。对猪的子宫增重效果也相差近千倍。但作为动物生长促进剂来说，则两者所用的剂量却相似（15，16）。因此，用相同剂量的雌二醇和玉米赤霉烯酮处理动物时，玉米赤霉烯酮远比雌二醇安全，不致发生组织增生等副作用。又据 Sharp 和 Dyer（17）报导，玉米赤霉醇在动物体内代谢速度很快，并不残留在各种食用组织中。他们用同位素标记的玉米赤霉醇处理肉用牛，然后分批分期（处理后65、80、95、110和125天）剖检，除在95天前的胆汁中发现有残留的玉米赤霉醇外，在其它多批样品的心、肝、肺、肾、脾、胰、小肠、肌肉和脂肪等可食组织中，均未发现有玉米赤霉醇的残留，而以往作为动物生长促进剂的己烯雌酚（DES），则因在肝脏内有残留，国外已禁止使用。

至于玉米赤霉烯酮类物质的毒性问题，由于自发现有高度致癌活性的黄曲霉毒性以来，在人们心目中形成了“恐霉病”心理，不能不给予充分的重视。但至今有关玉米赤霉烯酮毒性的报导只是限于：引起猪的阴门肿大外翻、乳房隆起（药剂解除后，症状很快消失）；引起怀孕母猪流产以及影响动物胎儿的骨骼发育等（18）。根据我们的试验看到玉米赤霉烯酮（400 μ g）可阻止小白鼠胎泡的着床（未发表资料）。迄今尚未见玉米赤霉烯酮招致其它器官受损或致癌的报导。美国商业溶剂公司研究组最近报告（14），用玉米赤霉烯酮或玉米赤霉醇长期处理大白鼠、狗和猴，除非是在大剂量（20—25mg/kg/天）下会减低食欲和体重外，没有发现组织病变。有人（19）担心，以感染玉米赤霉菌的谷物，作奶牛饲料是否会在牛奶中出现玉米赤霉烯酮类物质而有害胎儿，或因用感染此菌的大麦酿制啤酒而造成啤酒污染，但这些仅是推测，尚未见肯定的报导。

由于玉米赤霉烯酮类物质作为动物生长促进剂效果明显、用量少、不产生副作用和在可食组织中无残留，因此有应用价值。

此外，美国商业溶剂公司研究组指出（14），玉米赤霉烯酮和玉米赤霉醇有降低血脂、胆固醇和血钙的作用，并开始试用治疗人绝经期后的并发症。

但玉米赤霉菌除产生玉米赤霉烯酮外，还可产生催吐毒素和一种抑制小白鼠生长的毒素（我们已获得这种毒素的结晶，其理化性质尚待研究），因此不能以玉米赤霉菌的发酵物或发霉谷物喂饲动物。

玉米赤霉烯酮对高等植物生长发育的影响很值得深入研究。冬性作物必须通过低温春化阶段才能为开花（性器官形成）奠定基础，但低温只是外界条件，植物本身必然会存在决定春化的内在因素，即所谓的“春化素”。人们长期以来都在企图寻找这类物质，但未获得成功。玉米赤霉烯酮类物质出现于春化冬小麦生长锥中的事实，说明此类物质确与春化有关，但由于它的含量少，而且又处于动态变化之中，也许是造成难以被提取的主要原因。我们正准备从大量春化的冬麦生长锥中提取这种物质，进一步确定其化学性质和作用效果。至于外加玉米赤霉烯酮尚不能使冬小麦抽穗，可能是因为被吸收的浓度低，或者是缺少其它因素的配合，

这些问题都待进一步研究明确。同时,在其它冬性作物中也准备展开类似的研究,由此或可为植物性激素的研究开辟途径。

赤霉素是首先在水稻恶苗病菌中被发现的,其后才被证明它是高等植物的天然生长激素;玉米赤霉烯酮或许也是植物的一种天然性激素。

* * * *

在工作进行中,得到俞大绂、沈其益和姜成后三位教授的关心和鼓励,并审阅和修改本文;在研究有关影响小麦发育问题上,吴兰佩付教授曾提供许多宝贵意见,特此致谢。

玉米赤霉烯酮紫外光谱由中国科学院微生物研究所宋大康同志代测,红外光谱由中国科学院植物所廖承寿同志代测,玉米赤霉烯酮照片由我校余炳生同志拍摄;墨西哥春小麦波他姆品种由我校郑丕尧教授供给并提供试验用地,冬小麦 1230 由吴兰佩付教授供给,农大 139 由中国农科院原子能所张维强同志供给,1817 由本校刘广田同志供给;小白鼠试验得到农业部生物药品监察所及北京市食品公司卫生科的热情支持;中国农科院原子能所小麦组提供小麦试验用地和温室条件;北京鸭试验由北京市食品公司鸭场及北京市海淀区肖家河公社鸭场提供试验材料和条件,北京市畜牧局有关同志帮助剖检北京鸭,在此一并致谢。

参 考 文 献

1. Stob, M., R.S. Baldwin, J. Tuite, F.N. Andrews, and K.G. Gillette. 1962. Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*. 196: 1318.
2. Andrews, F.N. and M. Stob. 1965. U.S. Patent 3, 196, 619.
3. Christensen, C.M., G.H. Nelson, and C.J. Mirocha. 1965. Effect on the white rat uterus of a toxic substance isolated from *Fusarium*. *Appl. Microbiol.* 13: 653-659.
- ✓ 4. Urry, W.H., H.L. Wehrmeister, E.B. Hodge, and P.H. Hidy. 1966. The structure of zearalenone. *Tetrahedron letters*, No. 27: 3109-3114. 1966
- ✓ 5. Mirocha, C.J., C.M. Christensen, and G.H. Nelson. 1967. Estrogenic metabolite produced by *Fusarium graminearum* in stored corn. *Appl. Microbiol.* 15: 497-503.
6. Caldwell, R.W., J. Tuite, M. Stob, and R. Baldwin. 1970. Zearalenone production by *Fusarium* species. *Appl. Microbiol.* 20: 31-34.
- ✓ 7. Mirocha, C.J., C.M. Christensen, and G.H. Nelson. 1968. Toxic metabolites produced by fungi implicated in mycotoxicoses. *Biotechnol. & Bioeng.* 10: 469-482.
8. Mirocha, C.J., C.M. Christensen, and G.H. Nelson. 1971. F-2 (Zearalenone) estrogenic mycotoxin from *Fusarium*. *Microbial Toxins* VII: 107-138.

- ① 9. Nelson, R.R., C.J. Mirocha, D. Huisingh, and A. Tijerina-Menchaca. 1968. Effects of F-2, an estrogenic metabolite from *Fusarium* on sexual reproduction of certain ascomycetes. *Phytopath.* 58: 1061-1062.
- V 10. Nelson, R.R. 1971. Hormonal involvement in sexual reproduction in the fungi with special reference to F-2, a fungal estrogen. p.181-205. In S. Akai and S. Juchi (ed.) *Morphological and biochemical events in plant parasite interaction*. The Phytopathological Society of Japan, Tokyo.
- ① 11. Wolf, J.C. and C.J. Mirocha. 1973. Regulation of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium roseum* 'Graminearum') by F-2. *Can. J. Microbiol.* 19: 725-734.
- ① 12. Wolf, J.C. and C.J. Mirocha. 1977. Control of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium roseum* 'Graminearum'). *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 546-550.
13. Bacon, C.W., J.D. Robbins, and J.K. Porter. 1977. Media for identification of *Gibberella zeae* and production of F-2 (Zearalenone). *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 445-449.
14. Hidy, P.H., R.S. Baldwin, R.L. Greasham, C.L. Heith, and J.R. McMullen. 1977. Zearalenone and some derivatives: Production and biological activities. *Adv. Appl. Microbiol.* 22: 59-82.
15. Perry, T.W., M. Stob, A.D. Huber, and R.C. Peterson. 1970. Effect of subcutaneous implantation of resorcylic acid lactone on performance of growing and finishing beef cattle. *J. Animal Sci.* 31: 789-793.
16. Sharp G. D. and I. A. Dyer. 1971. Effect of zearalanol of the performance and carcass composition of growing-finishing ruminants. *J. Animal Sci.* 33: 865-871.
17. Sharp, G.D. and I.A. Dyer. 1972. Zearalanol metabolism in steers. *J. Animal Sci.* 34: 176-179.
18. Ruddick, J.A., P.M. Scott, and J. Harwing. 1976. Teratological evaluation of zearalenone administered orally to the rat. *Bull. Environ. Contamin. and Toxicol.* 15: 678-681.
19. Schoental, R. 1977. Health hazards due to oestrogenic mycotoxins in certain foodstuffs. *Intern. J. Environmental Studies.* 11: 149-150.

STUDIES ON ZEARALENONE

Li Chi-lun, Zhu Tung-xia, Zhang Chi
(*Dept. of Plant Protection*)

Li Bao-ren, Deng Ze-pei, Li Yong-sheng
(*Dept. of Veterinary Science*)

Meng Fan-jing
(*Dept. of Agronomy*)

Abstract

An uterotrophic substance was extracted in crystalline form from the culture of *Fusarium roseum* 'graminearum' strain BAU-z8, which was isolated from infected grains of corn harvested in the western suburb of Beijing. According to its melting point, ultraviolet and infrared spectra and other properties, it was identified as Zearalenone. About 1.4 grams of zearalenone was extracted from a culture of BAU-z8 growing on the medium made from 1 kg. of rice. The conditions for biosynthesis of zearalenone and the method of extraction and purification as well as its biological activity are described in this paper.

The experimental data showed that zearalenone stimulated the growth of uterus of white mouse and the growth of Beijing duck significantly. The average uterine weight of young female mice treated with zearalenone by subcutaneous injection increased 4-5 fold in 4 days as compared with the control. The average body weight of Beijing ducks fed with crystalline zearalenone, at the beginning of forced-feed, in gelatin capsules at a rate of 0.7 mg/day was about 16.5% ($P < 0.01$) heavier than that of the control in the 10 days.

It is interesting to point out that a zearalenone-like substance was also found in the growing points of vernalized winter wheat seedlings.

This substance has the same R_f value and fluorescence as that of the zearalenone on silica gel thin layer chromatogram. However, the winter wheat treated by soaking seeds in a solution of zearalenone, 100 ppm., dissolved in 0.5% sodium bicarbonate aqueous solution, for about 2 days at room temperature did not ear when it was planted in green house or in the field at normal temperature under long day condition, though the growing points had developed into double ridges (spikelet primordia). On the other hand, the spring wheat('Potam' variety of Mexico) treated with the same concentration of zearalenone eared about 5 days earlier than that of the control. Further investigations on the effectiveness of zearalenone on the growth and development of wheat are still in progress.