

刘笑笑,王莹,仇建飞,等. 北方春小麦赤霉病镰刀菌种群及其毒素化学型与毒素污染分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):199-202.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.051

北方春小麦赤霉病镰刀菌种群及其毒素化学型与毒素污染分析

刘笑笑,王莹,仇建飞,孟繁磊,魏春雁

[吉林省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所/农业部农产品质量安全风险评估实验室(长春),吉林长春 130033]

摘要:从采自吉林省、黑龙江省和内蒙古自治区的 55 份小麦样品中分离获得 84 株镰刀菌单孢菌株,用特异性引物对镰刀菌种和 B 型毒素化学型进行鉴定,用液相色谱-质谱联用仪对毒素污染情况进行定性定量分析。结果表明,亚洲镰刀菌(*Fusarium asiaticum*)和禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)是北方春小麦的优势致病种;脱氧雪腐镰刀菌烯醇是北方春麦区的优势毒素化学型,且以产生 15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇为主;6 种 B 型镰刀菌生物毒素在北方春小麦中均未检出,表明北方春小麦整体质量安全水平较高。

关键词:北方春小麦;赤霉病;镰刀菌;毒素化学型;毒素分布;毒素污染

中图分类号:S432.4⁺4;S435.121.4⁺5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0199-04

小麦的种植面积仅次于水稻,是我国一半人口的主粮,小麦及其制品的质量安全直接关系到我国的食品安全^[1]。北方地区由于气候条件限制,小麦种植基本以春小麦为主。北方春麦区主要包括黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古等地区,在全国小麦生产中占有重要地位。小麦赤霉病别称红麦头、麦穗枯、烂麦头,是长江流域冬麦区以及北方春麦区常发性病害,该病是由多种镰刀菌引起的,亚洲镰刀菌(*Fusarium asiaticum*)和禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)是引起小麦赤霉病的优势致病种群^[2-5]。近年来,该病害流行范围明显由南向北转移^[6]。镰刀菌不仅影响小麦的产量和品质而造成经济损失,更重要的是其产生的代谢物——镰刀菌毒素,不管是食用还是饲用,对人和畜禽都存在安全风险。镰刀菌毒素对人和畜禽的肝脏、肾脏、细胞免疫机能等都有不同程度的毒性作用,甚至对肿瘤的发生有一定的影响^[7-16],因而镰刀菌毒素被列入自然发生的最危险的食物污染物之一^[17-18]。为明确北方春麦区镰刀菌种群结构、毒素化学型分布特点以及毒素污染情况,本研究对 2016 年采集自北方春麦区(吉林、黑龙江、内蒙古等地区)的 55 份小麦样品致病种群镰刀菌单孢菌株进行分离、毒素化学型鉴定及单体毒素的定性定量检测,旨在明确镰刀菌在北方春麦区的分布与毒素污染情况,对人们食用安全小麦以及小麦产业健康发展具有重要的指导意义。

1 材料与方法

收稿日期:2017-07-24

基金项目:国家农产品质量安全风险评估重大专项(编号:GJFP201600001003);国家粮油作物产品质量安全风险评估项目(编号:GJFP201700102);吉林省农业科技创新工程项目(编号:CXGC2017TD011、CXGC2017ZY038)。

作者简介:刘笑笑(1984—),女,吉林通化人,硕士,助理研究员,主要从事农产品质量安全研究。E-mail:xiaoxiao19840203@yeah.net。
通信作者:魏春雁,博士,研究员,主要从事农产品质量安全研究。E-mail:weichy@yeah.net。

1.1 材料与试剂

1.1.1 供试样品 在小麦收割期,从吉林省的松原市、白城市、四平市,黑龙江省的齐齐哈尔市、黑河市(含九三农场),内蒙古自治区的呼伦贝尔盟、巴彦淖尔盟等 7 个地区分别收集小麦麦粒,共采集 55 份样品,每份样品质量为 2.5 kg。

1.1.2 化学试剂 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar,简称 PDA)培养基,购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;引物 DNA、琼脂糖 N 和 DNA 提取试剂盒,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;预混 DNA 聚合酶,购自长春海灵科贸有限公司;甲醇(色谱纯),购自赛默飞世尔科技公司;甲酸(分析纯),购自西陇化工股份有限公司;乙腈(色谱纯),购自山东禹王实业有限公司化工分公司;乙酸(分析纯),购自天津市化学试剂一厂;玉米赤霉烯酮(zearealenone,简称 ZEN)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol,简称 DON)、3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyl-deoxynivalenol,简称 3-AcDON)、15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyl-deoxynivalenol,简称 15-AcDON)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷(deoxynivalenol-3-glucoside,简称 D3G)、雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol,简称 NIV)(纯度≥99%),均购自北京坛墨质检科技有限公司;琼脂粉,购自北京依托生物。

1.1.3 仪器设备 Presoclave II 型高压灭菌锅,购自西班牙 Selecta 公司;SW-CJ 超净工作台,购自苏州安泰空气技术有限公司;DNP-9162BS-III 恒温培养箱,购自上海新苗医疗器械制造有限公司;CX21FS1 显微镜,购自日本 Olympus 公司;C1000 PCR 仪(伯乐),购自长春美信科贸有限公司;DYY-8C 双稳定时电泳仪,购自北京六一生物科技有限公司;CT15RE 台式高速冷冻离心机,购自日立工机株式会社;QTRAP 5500 液相色谱-质谱/质谱联用仪,购自美国 AB SCIEX 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离与纯化 每份样品称取 100 g,从中挑

选小麦赤霉病病粒。用 75% 乙醇表面消毒 30 s,1% NaClO 表面消毒 1 min,无菌水漂洗 3 次,灭菌滤纸吸干水分后分 5 点摆放在 PDA 培养基平板中,于 25 ℃ 倒置培养 72 h。将小麦籽粒周围长出的所有真菌挑出,转移至另一个新的 PDA 培养基平板中,25 ℃ 培养 72 h 后,在显微镜下观察,带有镰刀状大型分生孢子或椭圆形小型分生孢子的真菌,则为镰刀菌。

用 20 mL 无菌水将真菌洗掉,使其菌丝、孢子充分混匀,将混合液通过 3 层擦镜纸过滤,孢子在滤液中,加水稀释,涂至水琼脂培养基平板上,在光学显微镜下镜检,将仅有 1 个分生孢子的水琼脂转移至 PDA 培养基平板上,于 25 ℃ 培养 72 h 后挑取新鲜菌丝转入 PDA 培养基斜面培养,置于 4 ℃ 保存,即获得镰刀菌单孢菌株。

1.2.2 菌丝培养和 DNA 提取 挑取每个菌株至 PDA 培养基平皿中,于 25 ℃ 静置培养 72 h,收集菌丝用于 DNA 提取试验。DNA 提取采用十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyl trimethyl ammonium bromide,简称 CTAB) 法。将干净的研钵、研杵、药匙灭菌备用,将 CTAB 提取液置于 65 ℃ 水浴锅中预热,先加入少量灭菌的石碓砂,然后加入适量菌丝体再加入 1 000 μL 事先预热的 CTAB,迅速研磨后分装于离心管中,反复颠倒,使其迅速混溶,65 ℃ 水浴 1 h,其间每隔 15 min 拿出颠倒混匀 1 次。取出冷却后,加入等体积的苯酚氯仿,轻轻翻转混匀后,于常温 14 000 r/min 条件下离心 10 min,转移上清液至新离心管中,加入 2 倍体积的无水乙醇,轻轻转动离心管,待白色絮状沉淀出现,或可放置 -20 ℃ 冰箱 30 min 以上,

于常温 8 000 r/min 条件下离心 5 min,倒干上清液,加入 1 000 μL 75% 乙醇,轻轻摇匀,8 000 r/min 离心 5 min,漂洗 2 次,晾干后,加适量 TE 缓冲液,4 ℃ 溶解。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA。

1.2.3 镰刀菌种的鉴定 采用 Yang 等的研究方法^[3,6],对 84 株 镰 刀 菌 用 FgCTPSf024、FgCTPSr536、FgCTPSf177、FgCTPSr306 等 4 条引物进行竞争 PCR 扩增,此为第 1 组竞争 PCR 扩增。采用 25 μL 扩增体系:1.0 μL DNA 模板,2.0 μL dNTPs,2.5 μL PCR 缓冲液,0.5 μL *Taq* 酶,1.0 μL FgCTPSf177,1.0 μL FgCTPSr306,0.5 μL FgCTPSf024,0.5 μL FgCTPSr536,用无菌水补至 25 μL。PCR 扩增反应程序:95 ℃ 2 min;95 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。用 FgTEFf124、FgTEFf364、FgTEFr411、FgTEFr590 等 4 条引物进行第 2 组竞争 PCR 扩增。4 条引物分别添加 0.50、0.50、0.25、0.25 μL,其他组分和扩增反应程序与第 1 组竞争 PCR 相同。

对于非禾谷镰刀菌群 (*F. graminearum* clade,简称 *Fg* clade) 菌株,用燕麦镰刀菌 (*F. avenaceum*) 种的特异性引物 (FaF/FaR) 进行 PCR 扩增,反应体系中引物分别添加 1 μL,其他组分与上述反应体系相同。PCR 扩增反应程序:95 ℃ 2 min;95 ℃ 1 min,60 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。以上 PCR 产物均用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

种类/化学型	引物名称	序列(5'→3')
禾谷镰刀菌群(<i>Fg</i> clade)	Fgctpsf024	TCGGAAGAGTTTCTGCC
禾谷镰刀菌群(<i>Fg</i> clade)	Fgctpsr536	GGAGCTGGCGGCG
亚洲镰刀菌(<i>F. asiaticum</i>)	Fg6ctpsf177	GTCTCACTTCAAGCCA
禾谷镰刀菌群,除 <i>F. meridionale</i> 之外的 <i>Fg</i> clade	Fgctpsr306	CCTTGTCATCCATAGAG
禾谷镰刀菌群(<i>Fg</i> clade)	Fgteff124	CGGTCACTTGATCTACCAG
禾谷镰刀菌群(<i>Fg</i> clade)	FgteffR590	GAATGTGATGACAGCAGTG
禾谷镰刀菌(<i>F. graminearum</i>)	Fg7teff364	CTCGAGCGACAGGCGTC
<i>F. acacia - mearnsii</i>	Fg5teffR411	GACAGGTGGTTACTGACTA
化学型	TOXP1	GCCGTGGGGRTAAAAGTCAAA
化学型	TOXP2	TGACAAGTCCGGTCTGCACTAGCA
化学型	Tri303F	GATGGCCGCAAGTGGA
化学型	Tri303R	GCCGACTGCCCTATTG
化学型	Tri315F	CTCGCTGAAGTTGGACGTAA
化学型	Tri315R	GCTTATGCTCTCAACGGACAAC
燕麦镰刀菌(<i>F. avenaceum</i>)	FaF	CAAGCATTGTCGCCACTCTC
	FaR	GTTTGCTCTACCGGGACTG

1.2.4 毒素化学型的测定 测定 DON 和 NIV 毒素化学型时,使用 TOXP1 和 TOXP2 引物,各 0.5 μL,其他反应组分同“1.2.3”节。PCR 扩增程序:95 ℃ 2 min;95 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 50 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。采用 Jennings 等的方法^[19]对 DON 毒素化学型的菌株进行 3 - AcDON 和 15 - AcDON 鉴定。2 个 PCR 反应所需引物分别为 0.5 μL Tri303F/Tri303R、0.5 μL Tri315F/Tri315R,其他反应组分同“1.2.3”节。扩增程序:95 ℃ 2 min;95 ℃ 1 min,60 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物均用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行测定。引物序列见表 1。

1.2.5 镰刀菌毒素检测 准确称取 5.000 g 小麦样品(麦粒磨成的麦粉)于离心管中,加入 25 mL 提取液(乙腈、水、乙酸的体积比为 80 : 19 : 1),振荡 1.5 h,超声提取 30 min,14 000 r/min 离心 15 min,取 1 mL 上清液,过 0.22 μm 有机微孔滤膜,上液相色谱 - 质谱/质谱仪进行测定。色谱条件:色谱柱为 Kinetex SB - C18,2.1 mm × 100 mm × 1.7 μm;柱温为 40 ℃;进样量为 3 μL;流动相组成:A 相为 10% 甲醇(含 0.1% 甲酸),B 相为甲醇;流速为 0.3 mL/min。质谱条件:电离源模式为电喷雾离子化;电离源极性为正负模式同时扫描;雾化器为氮气;检测方式:多离子反应监测。

2 结果与分析

2.1 病原菌菌株的分离与致病菌种群结构分析

共分离获得 84 株单孢菌株,各地分离的单孢菌株情况见表 2。84 株单孢菌株中,共检测到亚洲镰刀菌、*F. acaciae - meansii*、燕麦镰刀菌、*F. meridionale*、禾谷镰刀菌等 5 个镰刀菌种。除内蒙古巴彦淖尔盟地区外,其余采样地区均检测到禾谷镰刀菌菌株,占有菌株的 42.86%;其次有 2 个采样地区检测到亚洲镰刀菌,占有分离菌株的 27.38%。各采样

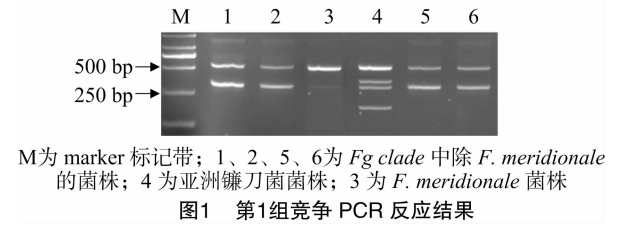
地区的镰刀菌致病种存在差异,吉林省镰刀菌种群相对复杂,检测到 5 个镰刀菌种;黑龙江省检测到 *F. acaciae - meansii*、*F. meridionale*、禾谷镰刀菌等 3 个种;内蒙古检测到亚洲镰刀菌、燕麦镰刀菌、禾谷镰刀菌等 3 个种,且主要集中在亚洲镰刀菌和禾谷镰刀菌 2 个种。这与 Gale 等的研究结果^[4-5]一致。亚洲镰刀菌在吉林省的小麦赤霉单孢分离物中检测到 12 株,在内蒙古检测到 2 株,该结果与 Parry 报道的亚洲镰刀菌主要分布于凉爽或海洋性气候地区^[4]较为吻合。

表 2 不同采样地点镰刀菌种群分布情况

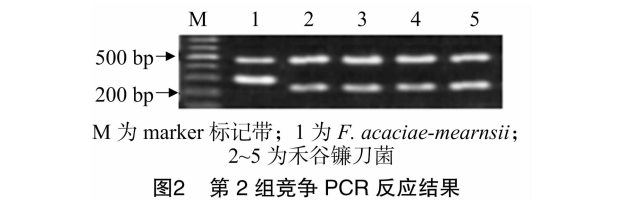
省份	地市	菌株数量(株)					总量
		亚洲镰刀菌 (<i>F. asiaticum</i>)	<i>F. acaciae - meansii</i>	燕麦镰刀菌 (<i>F. avenaceum</i>)	<i>F. meridionale</i>	禾谷镰刀菌 (<i>F. graminearum</i>)	
吉林省	松原市	4	3	8	0	1	16
	白城市	0	3	4	0	2	9
	四平市	0	0	0	2	2	4
黑龙江省	齐齐哈尔市	0	0	0	0	4	4
	黑河市	0	1	0	2	12	15
内蒙古自治区	呼伦贝尔盟	0	0	2	0	15	17
	巴彦淖尔盟	19	0	0	0	0	19

2.2 PCR 鉴定结果

由图 1 可知,亚洲镰刀菌菌株扩增出 4 条条带,分别为 536、388、311、162 bp,引物 FgCTPSf177 和 FgCTPSr306 在亚洲镰刀菌菌株上扩增出 162 bp 的特征条带;FgCTPSr306 和 FgCTPSf024 在 *Fg clade* 中扩增出 311、536 bp 的特征条带;FgCTPSf024 和 FgCTPSr536 在 *F. meridionale* 菌株上扩增出 536 bp 的特征条带。



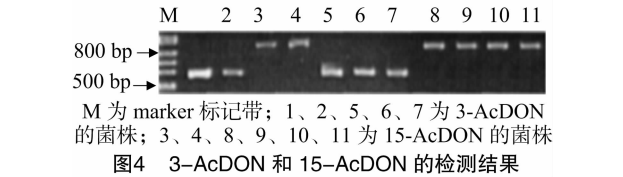
由图 2 可知,*Fg clade* 菌株扩增出 482 bp 条带,禾谷镰刀菌菌株扩增出 261 bp 条带,*F. acaciae - meansii* 扩增出 306 bp 条带。而燕麦镰刀菌菌株扩增出 920 bp 特征带。



由图 3、图 4 可知,用引物 ToxP1/ToxP2 区分 DON 和 NIV 毒素,DON 毒素的特征条带为 300 bp,NIV 毒素的特征条带为 360 bp。DON 毒素菌株中,引物 Tri303F/Tri303R 扩增出 583 bp 条带的菌株为 3 - AcDON,引物 Tri315F/Tri315R 扩增出 863 bp 条带的菌株为 15 - AcDON。

2.3 镰刀菌毒素化学型分析

由表 3 可知,DON 和 NIV 毒素化学型之间存在明显的地域分布。DON 毒素化学型是北方春麦区赤霉病菌的优势毒素类型,而NIV毒素化学型仅在吉林省麦区出现。在产生



DON 毒素化学型的菌株中,北方春麦区 DON 毒素类型均以 15 - AcDON 为主。zhang 等研究表明,DON 是我国小麦赤霉病菌产生主要的毒素化学类型,且北方冷凉地区以产生 15 - AcDON 为主,南方温暖地区以产生 3 - 乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3 - AcDON)为主^[5,20-21],本研究结果与上述观点一致。菌株产生乙酰 DON 毒素的类型与该菌株所属种存在一定关系。亚洲镰刀菌、燕麦镰刀菌、禾谷镰刀菌等 3 种菌株主要产生 15 - AcDON;*F. acaciae - meansii* 和 *F. meridionale* 这 2 种菌株只产生 15 - AcDON。

2.5 镰刀菌毒素检测结果与分析

对北方春小麦中雪腐镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷、3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇等 6 种 B 型镰刀菌毒素进行测定。结果显示,3 个省(自治区)7 个市(盟)所有被检样品中,6 种毒素均未检出。可能是病害程度较轻,毒素水平很低,再者可能是小麦皮对籽粒起到了保护作用。6 种毒素的检出限见表 4。

3 结论

北方春麦区小麦镰刀菌病害预防应以亚洲镰刀菌和禾谷

表 3 各省镰刀菌毒素化学型分布情况

镰刀菌类型	毒素化学型	毒素化学型数量(个)			
		吉林省	黑龙江省	内蒙古	总量
亚洲镰刀菌 (<i>F. asiaticum</i>)	NIV	4	0	0	4
	DON	0	0	20	20
	3 - AcDON	0	0	1	1
	15 - AcDON	0	0	19	19
<i>F. acaciae - meansii</i>	NIV	2	0	0	2
	DON	4	1	0	5
	3 - AcDON	0	0	0	0
	15 - AcDON	4	1	0	5
燕麦镰刀菌 (<i>F. avenaceum</i>)	NIV	0	0	0	0
	DON	12	0	0	12
	3 - AcDON	1	0	0	1
	15 - AcDON	11	0	0	11
<i>F. meridionale</i>	NIV	2	0	0	2
	DON	0	2	0	2
	3 - AcDON	0	0	0	0
	15 - AcDON	0	2	0	2
禾谷镰刀菌 (<i>F. graminearum</i>)	NIV	0	0	0	0
	DON	5	19	16	40
	3 - AcDON	1	2	0	3
	15 - AcDON	4	17	16	37

表 4 镰刀菌毒素检出限

毒素化学型	检出限(μg/kg)
NIV	0.5
DON	0.1
ZEN	0.1
D3G	0.5
3 - AcDON	1.0
15 - AcDON	1.0

镰刀菌为主,生物毒素污染预防应以 15 - AcDON 为主;6 种 B 型镰刀菌生物毒素在被检样品中均未检出,表明北方春麦区小麦整体质量安全水平较高。

参考文献:

[1] 杨艳涛,秦 富. 世界与中国小麦市场贸易形势及政策分析[J]. 世界农业,2013(11):59-65.

[2] O'Donnell K,Ward T J,Geiser D M,et al. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade [J]. Fungal Genetics and Biology, 2004,41(6):600-623.

[3] Yang L,van der Lee T,Yang X,et al. *Fusarium* populations on Chinese barley show a dramatic gradient in mycotoxin profiles[J]. Phytopathology,2008,98(6):719-727.

[4] Gale L R,Chen L F,Hernick C A,et al. Population analysis of *Fusarium graminearum* from wheat fields in eastern China [J]. Phytopathology,2002,92(12):1315-1322.

[5] Zhang J B,Li H P,Dang F J,et al. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China [J]. Mycological Research,2007,111(Pt 8):967-975.

[6] 史文琦,杨立军,冯 洁,等. 小麦赤霉病流行区镰刀菌致病种及

毒素化学型分析[J]. 植物病理学报,2011,41(5):486-494.

[7] Thuvander A,Wikman C,Gadhasson I. *In vitro* exposure of human lymphocytes to trichothecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function [J]. Food and Chemical Toxicology,1999,37(6):639-648.

[8] Rotter B A. Invited review: toxicology of deoxynivalenol(vomitoxin) [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health,1996,48(1):1-34.

[9] Banotai C, Greene - Mcdowelle D M, Azcona - Olivera J I, et al. Effects of intermittent vomitoxin exposure on body weight, immunoglobulin levels and haematuria in the B6C3F1 mouse [J]. Food and Chemical Toxicology,1999,37(4):343-350.

[10] Alm H, Greising T, Brüßow K P, et al. The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on *in vitro* maturation of pig oocytes and in vitro culture of pig zygotes [J]. Toxicology in Vitro,2002,16(6):643-648.

[11] Minervini F,Dell'Aquila M E,Maritato F,et al. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on *in vitro* maturation of bovine oocytes and 17 β - estradiol levels in mural granulosa cell cultures [J]. Toxicology in Vitro,2001,15(4/5):489-495.

[12] Lioi M B, Santoro A, Barbieri R, et al. Ochratoxin a and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes [J]. Mutation Research,2004,557(1):19-27.

[13] 赵 虎,杨在宾,杨维仁,等. 日粮中添加玉米赤霉烯酮对仔猪生产性能和免疫功能影响的研究 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2009,40(4):489-494.

[14] Biehl M L,Prelusky D B,Koritz G D,et al. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs [J]. Toxicology and Applied Pharmacology,1993,121(1):152-159.

[15] International Agency for Research on Cancer World Health Organization. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins [J]. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1993,56:245-540.

[16] Hilakivi - Clarke L, Onojafe I, Raygada M, et al. Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis [J]. British Journal of Cancer,1999,80(11):1682-1688.

[17] 关贵民. 镰刀菌毒素的遗传毒性 [J]. 国外医学卫生学分册, 1990(2):92.

[18] 吴志远,张 帆,夏求洁. 食管癌高发区镰刀菌毒素的动物致癌性 [J]. 中华肿瘤杂志,1997,19(2):78.

[19] Jennings P, Coates M E, Turner J A, et al. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay [J]. Plant Pathology,2004,53(2):182-190.

[20] Li H P, Wu A B, Zhao C S, et al. Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol - and nivalenol - chemotypes of *Fusarium graminearum* [J]. FEMS Microbiology Letters,2005,243(2):505-511.

[21] Kim J C, Kang H J, Lee D H, et al. Natural occurrence of *Fusarium mycotoxins* (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(11):3798-3802.