

水稻穗腐病菌强致病力且高产伏马菌素菌株筛选

孙磊^{1,2} 王玲¹ 刘连盟¹ 侯雨萱¹ 黎起秦^{2,*} 黄世文^{1,2,*}

(¹中国水稻研究所, 杭州 310006; ²广西大学 农学院, 南宁 530003; *通讯联系人, E-mail: qqli5806@gxu.edu.cn, huangshiwen@caas.cn)

Screening for Strains of Rice Spikelet Rot Disease Pathogenic Fungus with High Fumonisin Production and Strong Pathogenicity

SUN Lei^{1,2}, WANG Ling¹, LIU Lianmeng¹, HOU Yuxuan¹, LI Qiqin^{2,*}, HUANG Shiwen^{1,2,*}

(¹China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ²College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530003, China; *Corresponding author, E-mail: qqli5806@gxu.edu.cn, huangshiwen@caas.cn)

Abstract: 【Objective】 The objective is to develop a stable and efficient artificial inoculation technique to identify the pathogenicity of different strains for rice spikelet rot disease (RSRD), and to test the ability of *F. proliferatum* to synthesize fumonisin in two culture media by detecting and analyzing the contents of fumonisin. Based on the methods, strains with high fumonisin production and strong pathogenicity were selected. 【Method】 Injection and spraying inoculation methods were adopted at booting and heading stages. The pathogenicity and stability of different inoculation methods at different growing stage of rice were investigated. The pathogenicity and the ability of fumonisin production of different strains were investigated by using suitable inoculation methods and HPLC-MS/MS analysis. 【Result】 The incidence of RSRD is high and stable with injection inoculation at pollen mother cell meiosis to maturing stages, and rice grain yield was significantly affected by inoculation during pollen mother cell formation to initial heading stage. The high pathogenic strains FP4, FP6, FP8, FP9 and FP10 were selected based on injection inoculation. The fumonisin synthesis assaying was conducted by using HPLC-MS/MS, and the strains FP4 and FP9, with high fumonisin production and strong pathogenicity were identified finally. The culture media made of rice grains was more suitable than that making of corn for fumonisin synthesis. 【Conclusion】 The invasion period of *F. proliferatum* of RSRD was pollen mother cell formation to full heading stage, the initial infection stage was pollen mother cell formation to meiosis stage, and the effect of RSRD on rice yield was closely related to infection stage.

Key words: rice spikelet rot disease; *Fusarium proliferatum*; artificial inoculation; fumonisin; pathogenicity; HPLC-MS/MS

摘要: 【目的】旨在确立稳定高效的水稻穗腐病人工接种技术, 鉴定不同菌株致病力。利用已有的伏马菌素检测方法分析测定两种培养基中不同菌株的伏马菌素合成能力, 基于上述方法筛选强致病力高产伏马菌素菌株。【方法】分别在水稻孕穗期和抽穗期采用注射法和喷雾法接种, 观察不同时期、不同接种方法下层出镰刀菌的致病性和稳定性; 利用适合的接种方法和液相色谱-串联质谱检测法比较不同菌株的致病力和产毒能力。【结果】在花粉母细胞减数分裂期-花粉母细胞成熟期采用注射法接种水稻穗腐病, 发病率较高且稳定; 在花粉母细胞形成期-始穗期接种对水稻产量影响较大。基于该方法成功筛选出了强致病力菌株FP4、FP6、FP8、FP9、FP10; 经HPLC-MS/MS分析测定了层出镰刀菌产生伏马菌素能力, 获得了强致病力高产毒菌株FP4和FP9。稻谷培养基比玉米培养基更适合层出镰刀菌合成伏马菌素。【结论】水稻穗腐病初侵染为花粉母细胞形成期-花粉母细胞减数分裂期, 最佳侵染时期为花粉母细胞形成期-齐穗期; 穗腐病对水稻产量的影响与感病时期密切相关。

关键词: 水稻穗腐病; 层出镰刀菌; 人工接种; 伏马菌素; 致病力; 液相色谱-串联质谱法

中图分类号: S435.111.4⁺6

文献标志码: A

文章编号: 1001-7216(2018)06-0610-07

目前, 水稻穗腐病(Rice spikelet rot disease, RSRD)在中国各大稻作区均有发生, 并在近年呈逐步加重趋势。该病在粳稻、籼粳杂交稻上发生明显

重于籼稻和籼型杂交稻, 水稻孕穗后期至抽穗扬花期遇阴雨高湿天气发生尤其严重。该病的主要侵染源为层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*), 该病原菌

收稿日期: 2018-04-16; 修改稿收到日期: 2018-06-25。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2018YFD020030405, 2016YFD0200801, 2017YFD0300409); 中国农业科学院科技创新工程资助项目(CAAS-ASTIP-2013-CNRR1); 国家自然科学基金资助项目(31800133); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ18C140005); 浙江省三农六方项目(CTZB-F160728AWZ-SNY1-4); 中国农业科学院协同创新项目(CAAS-XTXC2016012)。

不仅影响水稻产量,而且因产生真菌毒素,影响稻米品质^[1],其所产生的伏马菌素,可引起马脑白质软化症、猪肺水肿综合征等,并与人类食管癌的高发有关^[2-4]。研发高效且稳定的人工接种技术,是病原菌致病机制和寄主抗病性研究的基础。本研究前期试验表明,水稻穗腐病适宜的接种技术主要有颖内注射接种和喷雾接种,且颖内注射接种的发病率高于喷雾接种,但颖内注射接种过于繁琐且耗时^[5]。

目前,已鉴定的伏马菌素类似物有 28 种,被分为 4 组,即 A、B、C 和 P 组^[6,7]。其中,以 FB1 毒素为主,占总量的 70%。Rheeder 等^[7,8]发现有 15 种镰刀菌能够产生伏马菌素,其中李瑟组(*Section Liseola*)镰刀菌有 8 个,包括拟轮枝镰刀菌(*F. verticillioides*)和 *F. proliferatum*。通过研究玉米中分离的镰刀菌的产毒能力,发现不同菌种甚至相同菌种不同菌株之间产毒能力都存在较大差异,有些甚至不能产毒^[9]。Marin 等^[10]用玉米、小麦和大麦作为培养基,研究 *F. verticillioides* 和 *F. proliferatum* 产毒情况,结果发现玉米培养基最适合产毒,产毒量高达 2019.2 $\mu\text{g/g}$,而小麦和大麦分别只有 3.5 $\mu\text{g/g}$ 和 1.5 $\mu\text{g/g}$ 。目前尚未见在稻谷培养基中研究 *F. proliferatum* 的产毒情况。

基于此,本研究采用注射法和喷雾法分别对孕穗期和抽穗期的水稻进行人工接种,拟建立一套水稻穗腐病高效稳定的接种方法,观察不同时期接种病害发生及其对水稻产量性状的影响。利用上述方法比较不同菌株之间的致病力,对强致病力菌株采用液相色谱-串联质谱法测定其在稻谷和玉米培养基中的伏马毒素产生能力,比较不同菌株在同一基质或同一菌株在不同基质中的产毒能力差异,筛选高产毒菌株及培养基。研究结果可为水稻穗腐病病原菌侵染定殖、致病特性及水稻的抗病性鉴定等提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和水稻品种

层出镰刀菌(*F. proliferatum*)由本实验室分离保存。水稻品种为常规粳稻秀水 09,感穗腐病。

1.2 病原菌培养

将层出镰刀菌(*F. proliferatum*)在 PDA 平板上生长 7 d,取菌块转接到 100 mL PDA 液体培养基中,28℃下摇瓶培养 5 d,收集分生孢子悬浮液。

1.3 人工接种方法

参考 Huang 等^[5]前期研究,水稻穗腐病菌孢子

悬浮液浓度为 5×10^5 个/mL,在水稻不同的生育期进行接种。

孕穗期注射接种分别在孕穗期的不同阶段进行,包括 I 颖花分化期-雌雄蕊分化形成期、II 雌雄蕊分化形成期-花粉母细胞形成期、III 花粉母细胞形成期-花粉母细胞减数分裂期、IV 花粉母细胞减数分裂期-花粉母细胞成熟期。将新鲜的孢子液注入穗苞中部,直至注射部位有 3~5 滴菌液溢出。

抽穗期喷雾接种分别在抽穗期-开花期的不同阶段进行,包括 V 破口期-始穗期、VI 始穗期-抽穗盛期、VII 抽穗盛期-齐穗期。将新鲜的孢子液喷施于稻穗上,直至颖花表面有水滴湿透。

接种后的水稻置于可控温室内(温度保持在 28℃,光照周期 12 h 白天/12 h 黑夜,相对湿度为 80%~85%),每个处理接种 10~20 株水稻,以清水接种作对照。

1.4 层出镰刀菌的致病力鉴定

1.4.1 人工接种

将待测的层出镰刀菌在水稻花粉母细胞减数分裂期-花粉母细胞成熟期,采用注射法接种,接种孢子悬浮液浓度为 5×10^5 个/mL,以清水处理为对照。接种后的水稻植株置于温湿可控的温室内,分别于接种后 14 d 和 21 d 调查水稻穗腐病的发病情况,计算病情指数。

1.4.2 水稻穗腐病病情调查方法

参照 Huang 等^[5]将水稻穗腐病谷粒发病显症情况分为 4 类:全褐型,谷粒全部变成黄褐-黑褐色;半褐型,约 1/2 谷粒呈褐色;褐斑型,谷粒上有较大的褐斑;褐点型,谷粒上有褐色小斑点。抗性评价标准根据谷粒发病面积占谷粒总面积百分比可分为:0 级(0%),1 级(0.1%~10.0%),3 级(10.1%~25.0%),5 级(25.1%~50.0%),7 级(50.1%~75.0%),9 级(>75.1%)。

$DI = [\Sigma (\text{各级严重度谷粒数} \times \text{各级严重度代表值})] / [\text{调查总谷粒数} \times \text{严重度高级代表值(此处为 9)}] \times 100$ 。

根据上述抗性评价指标计算病情指数 DI,采用 Microsoft Excel 2003 软件对数据进行处理和绘图,运用 SAS 9.2 软件的 Duncan 法进行差异显著性检验,最大距离法进行聚类分析,简单相关法进行数据相关性分析,评价不同接种处理病害发生情况。

1.5 层出镰刀菌伏马菌素测定

1.5.1 接种体培养

将浓度为 10^6 个/mL 的层出镰刀菌孢子液接种到灭菌的玉米粒培养基(20 g 玉米)和稻谷培养基(20



图1 水稻感病穗(A)与感病白穗(B)

Fig. 1. Infected panicle(A) and infected white panicle(B) by rice spikelet rot disease.

g 稻谷)中充分摇匀, 28℃下恒温培养, 每隔 12 h 摇瓶 1 次, 培养 7 d。

1.5.2 伏马菌素检测

伏马菌素的测定参考李正翔^[11]的方法, 用液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定。液相色谱分离条件如下: ZORBAX Extend-C18 反相色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 A 为 0.1% 乙酸水溶液, B 为乙腈; 二元梯度洗脱 70%A 0~1min、70%~20%A 1~6min、20%A 6~9min、20%~70%A 9~9.01 min、70%A 9.01~15 min, 流速为 0.2 mL/min; 柱温为 30℃; 进样量为 2 μL。质谱参数: 电喷雾离子源 ESI, 正离子采集模式, 选择反应监测 SRM; 喷雾电压 3200 V; 辅助气 N₂ 压力 34.48 kPa, 鞘气 N₂ 压力 206.89 kPa; 毛细管温度 350℃; 离子源温度 350℃等。

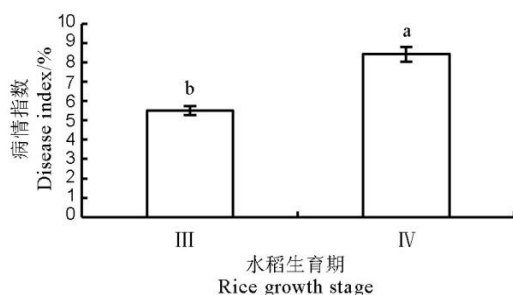


图2 水稻孕穗期注射接种病情指数

Fig. 2. Disease index of rice spikelet rot disease by injection inoculation at booting stage.

2 结果与分析

2.1 水稻穗腐病适接种时期与接种方法的确定

在水稻颖花分化期-雌雄蕊分化形成期注射接种, 不能引起水稻穗腐病发生。在雌雄蕊分化形成期-花粉母细胞形成期注射接种, 会导致水稻植株不能正常抽穗, 穗苞内为感病白穗(图 1)。在花粉母细胞形成期-花粉母细胞成熟期采用注射法接种(图 2)、破口期-齐穗期采用喷雾法接种(图 3), 均可导致水稻穗腐病发生。注射接种时, 稳定性较好, 花粉母细胞减数分裂期-花粉母细胞成熟期接种, 穗腐病病情指数显著高于花粉母细胞形成期-花粉母细胞减数分裂期。在 3 个不同时期喷雾接种的处理发病稳定性差, 且穗腐病病情指数无显著差异。

2.2 不同时期接种水稻穗腐病对水稻产量性状的影响

不同时期接种处理与清水对照相比(表 1), 在颖花分化期-雌雄蕊分化形成期接种, 对穗部性状无明显影响; 在花粉母细胞形成期-始穗期接种, 结实率、千粒重和穗重依次下降 73%~77%、22%~30%、30%~37%, 差异达极显著水平; 而始穗期-齐穗期接种, 对穗部性状的影响有所减弱, 结实率、千粒重、穗重比对照分别下降 10%~42%、13%~17%、5%~14%, 达显著水平。表明不同时期接种穗腐病菌对水稻穗部的影响不同, 颖花分化期-雌雄蕊分化形成期接种不会引发水稻穗腐病, 对穗部性状无显著影响。从花粉母细胞形成期-花粉母细胞减数分裂期开始, 接种后对穗部性状影响明显, 花粉母细胞形成期-始穗期接种对结实率和穗重影响最大, 花粉母细胞形成期-齐穗期接种对千粒重的影响呈现一个动态的过程, 随着接种时期的推迟, 对千粒重的影响逐步减弱。

2.3 层出镰刀菌致病力的差异

不同菌株注射接种水稻穗苞后, 穗腐病的发病

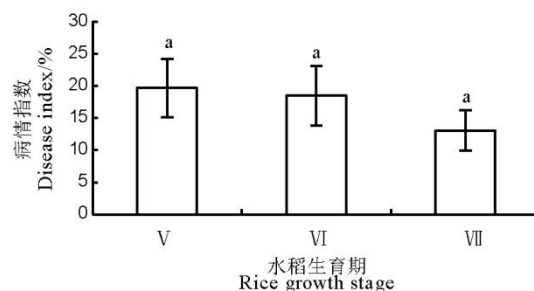


图3 水稻抽穗期喷雾接种病情指数

Fig. 3. Disease index of rice spikelet rot disease by spraying inoculation at heading stage.

表 1 不同生育期接种后穗部性状比较

Table 1. Comparison of panicle characteristics after inoculation at different growth stages.

生育期 Rice growth stage	结实率 Seed setting rate/%	千粒重 1000-grain weight/g	穗重 Panicle weight/g
清水 Clean water	92.42±3.10 a	21.06±0.22 a	3.45±0.22 a
颖花分化期-雌雄蕊分化形成期 Spikelet differentiation to pistil and stamen formation stage(I)	91.46±2.54 a	21.32±0.21 a	3.42±0.26 ab
花粉母细胞形成期-花粉母细胞减数分裂期 Pollen mother cell formation to meiosis(III)	21.27±1.90 d	14.71±0.31 f	2.18±0.14 c
花粉母细胞减数分裂期-花粉母细胞成熟期 Pollen mother cell meiosis to maturing stage(IV)	24.14±2.03 d	15.14±0.18 e	2.23±0.09 c
破口期-始穗期 Rupturing to initial heading(V)	24.15±3.06 d	16.41±0.26 d	2.41±0.35 c
始穗期-抽穗盛期 Initial heading to heading(VI)	53.79±2.04 c	17.46±0.16 c	2.96±0.31 b
抽穗盛期-齐穗期 Heading to full heading(VII)	83.56±3.16 b	18.32±0.21 b	3.27±0.42 ab

同列数据后跟不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下同。
Different lowercase letters in the same column mean significant difference at 5% level among treatments. The same as in tables below.

表 2 层出镰刀菌接种后的病情指数

Table 2. Disease index after inoculation with *F. proliferatum*

菌种 Strain	接种后 14 d 14 d after inoculation		接种后 21 d 21 d after inoculation	
	病情指数 Disease index/%	病害严重度 Disease severity	病情指数 Disease index/%	病害严重度 Disease severity
FP1	1.80±0.47 g	低 Low	2.98±0.27 ef	低 Low
FP2	3.72±0.87 de	中 Medium	5.16±0.73 cd	中 Medium
FP3	2.81±0.44 ef	低 Low	3.81±0.73 de	中 Medium
FP4	5.71±1.40 c	高 High	8.21±1.11 a	高 High
FP5	4.84±0.61 cd	中 Medium	4.58±0.31 cd	中 Medium
FP6	8.34±0.34 a	高 High	8.62±0.45 a	高 High
FP7	2.03±0.61 fg	低 Low	2.12±0.25 f	低 Low
FP8	4.86±0.44 cd	中 Medium	6.87±0.92 ab	高 High
FP9	8.47±0.48 a	高 High	9.29±0.53 ab	高 High
FP10	6.90±0.38 b	高 High	6.96±0.66 bc	中 Medium
FP11	4.51±0.34 d	中 Medium	4.63±1.23 cd	中 Medium
FP12	3.09±0.35 ef	低 Low	3.68±0.22 de	中 Medium

情况不同(图 5)。对不同菌株接种后 14 d 和 21 d 水稻穗腐病病情指数(表 2)组间进行相关性分析,两组结果显著相关($r = 0.90$, $P<0.05$), 14 d 和 21 d 致病力调查结果基本一致, 说明注射接种稳定可靠, 随病原菌与植株互作时间的延长, 病情指数有所提高。两次调查结果显示, 不同菌株间致病力差异显著, 对接种后 14 d 和 21 d 的病情调查结果进行聚类分析(图 4), 在接种后 14 d, 在相似系数 1.08 阈值下, 将层出镰刀菌分成 3 个致病力类群, 即强致病力群(FP4、FP6、FP9、FP10)、中等致病力群(FP2、FP5、FP8、FP11)和弱致病力群(FP1、FP3、FP7、FP12)。接种后 21d, 在相似系数 0.90 阈值下, 同样可将 *F. proliferatum* 分成 3 个致病力类群, 即强致病力(FP4、FP6、FP8、FP9)、中等致病力(FP2、

FP3、FP5、FP10、FP11、FP12)和弱致病力(FP1、FP7)。综合分析 14 d 和 21 d 的结果可知, FP4、FP6、FP8、FP9、FP10 为强致病力菌株。

2.4 层出镰刀菌伏马菌素合成能力的差异

选取 5 个强致病力的层出镰刀菌菌株进行 FB1 和 FB2 含量测定(表 3), 在稻谷培养基中层出镰刀菌同一菌株伏马菌素合成能力高于玉米培养基, FB1 提高约 120%~2010%, FB2 提高约 85%~4417%, 两种培养基中 FB1 含量均明显高于 FB2, 同一培养基中不同菌株之间合成伏马菌素能力差异显著。在玉米培养基中 FP4 是高产 FB1 和 FB2 菌素菌株, 在稻谷培养基中 FP4 和 FP9 是高产 FB1 菌素菌株, FP9 同时也是高产 FB2 菌素菌株。FP4 和 FP9 为高产伏马菌素的强致病力菌株。

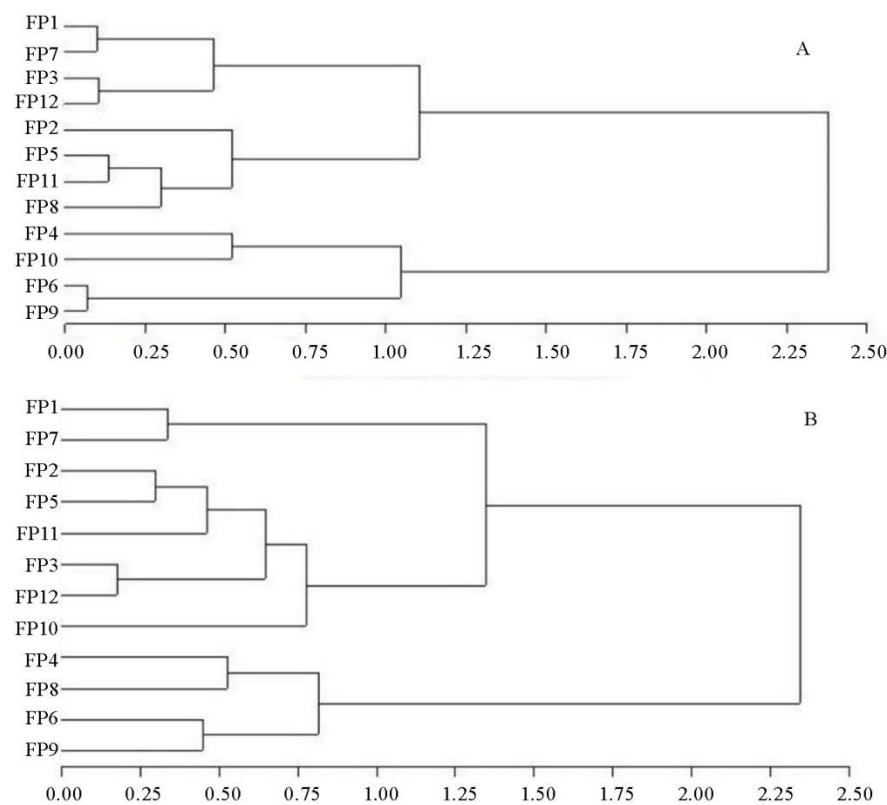


图 4 基于最大距离法对各菌株的致病力进行聚类分析
Fig. 4. Clustering analysis of pathogenicity of *F. proliferatum* strains based on maximum distance method.

3 讨论

由于水稻穗期生长变化规律复杂，水稻穗腐病菌的侵染过程仍不明确，单个稻穗上较难综合评价病菌的侵染水平。本研究比较了喷雾接种法和注射接种法在水稻不同生育期接种层出镰刀菌对穗腐病发生的影响。水稻颖花分化期至雌雄蕊分化形成期接种不能引发穗腐病发生，水稻花粉母细胞形成期至齐穗期接种能引起水稻发病。表明水稻穗腐病初侵染时期为花粉母细胞形成期至花粉母细胞减数分裂期，该病害在花粉母细胞形成期至齐穗期均可发生。相对另一镰刀菌病害——小麦赤霉病，禾谷镰刀菌可在小麦多个生长时期侵染多个部位，造成小麦苗腐、基腐、秆腐和穗腐，穗腐是其最主要病症，也是危害最严重的病症^[12-14]。水稻穗腐病菌在花粉母细胞形成期至始穗期接种时，对产量性状的影响最大，而后期接种对产量性状影响明显下降，说明水稻穗腐病对产量的影响与感病时期密切相关。

两种接种方法比较，注射接种法操作简便，发病情况较严重，稳定性较好，不同处理间差异明显，



A—弱致病力菌株；B—中等致病力菌株；C—强致病力菌株。
A, Weak pathogenic strain; B, Moderate pathogenic strain; C, Strong pathogenic strain.
图 5 层出镰刀菌接种后病情
Fig. 5. Disease severity after inoculation with *F. proliferatum*.

表 3 层出镰刀菌产生伏马菌素能力的比较

Table 3. Comparison of the ability of *F. proliferatum* to produce FB1 and FB2.

菌株 Strain	FB1 含量 FB1 content/(mg kg ⁻¹)		FB2 含量 FB2 content/(mg kg ⁻¹)	
	玉米 Corn kernel	稻谷 Paddy rice	玉米 Corn kernels	稻谷 Paddy rice
FP4	54.49±1.46 a	119.98±1.60 a	22.75±0.03 a	42.17±0.56 b
FP6	18.46±0.41 d	57.04±0.82 c	5.36±0.14 c	31.85±0.87 c
FP8	0.75±0.03 e	15.83±0.07 d	0.23±0.00 d	10.39±0.13 e
FP9	33.52±0.28 b	118.16±0.55 a	10.43±0.12 b	45.99±0.48 a
FP10	24.84±0.68 c	63.88±1.84 b	10.53±0.43 b	27.21±1.12 d

但试验中发现病原菌浓度过高，或者雌雄蕊分化形成期-花粉母细胞形成期接种，会出现稻穗无法抽穗或抽穗不全；喷雾接种法稳定性差，不同处理间差异不明显。综合考虑，选择注射接种法更好，但注射接种时要注意接种菌液浓度不宜过高，接种时期要准确。喷雾接种相对注射接种法所需菌液量要多3~5倍，其菌群基数远高于注射法，这是导致稻穗喷雾接种病情指数高于穗苞注射接种的主要原因。喷雾接种法中病原菌与寄主没有稳定的互作环境，导致该方法稳定性差。注射法接种时出现不能正常抽穗的情况，原因可能是病原菌浓度过高，感染水稻幼穗营养供应不足而死亡，也有可能因病原菌产生的真菌毒素导致穗部细胞死亡，或者引起水稻穗部某些应激反应不能抽穗。Boenisch等^[15]在小麦赤霉病相关研究中发现，其真菌毒素单端孢霉烯的生物合成能诱导病原菌侵染结构的形成。本研究中病原菌层出镰刀菌产生的伏马菌素对侵染是否有影响需要进一步研究。相对另一水稻穗期病害稻曲病而言，水稻穗腐病的接种成功率较高，喷雾法和注射法接种后均有较明显的病症，这可能与病原菌侵染方式有关。稻曲病菌侵染对初侵染点要求比较严格，是位于水稻小花子房和浆片之间的三个花丝的上半部分，这也是导致稻曲病人工接种成功率低的重要原因^[16-18]，而水稻穗腐病目前初侵染点不明，但根据其接种成功率较高可判断其初侵染点并没有严格要求。

本研究比较了层出镰刀菌在玉米与稻谷两种基质中伏马菌素的合成能力，发现两种基质中同一菌株伏马菌素合成能力有较大差异，稻谷培养基比玉米培养基更适合层出镰刀菌合成伏马菌素。这可能与菌株来源有关。本研究所用菌株均是从感穗腐病的水稻中分离得到，所以菌株在稻谷培养基中能更好合成伏马菌素，但更主要的原因可能与两种基质的理化性质相关。Woloshuk等^[19-21]研究发现糊精或支链淀粉作为唯一碳源时，*F. verticillioides*能产

生更多的FB1；Shim等^[22-24]研究表明，氮水平与FB1的生物合成呈负相关，在高浓度氮培养基上伏马菌素的产生则会受到抑制；Keller等^[25-28]研究发现，酸性pH值会促进层出镰刀菌中FB1的合成。这些都可能是导致菌株在稻谷培养基中合成伏马菌素能力更强的原因。不同层出镰刀菌在同一培养基中合成伏马菌素能力差异较大，这与Nelson等^[8]、Rheeder等^[7]研究结果一致，分析发现不同菌株甚至相同菌株的不同菌株之间合成伏马菌素能力均存在较大差异。

本研究在前期研究的基础上，改进并完善了水稻穗腐病人工接种的接种时期、接种方法，接种环境条件等，确立了穗腐病菌在可控环境下稳定的接种技术，该技术保证病菌侵染成功率高，可确定为水稻穗腐病人工接种优选方法。该接种方法的确立为进一步研究穗腐病菌与水稻的互作关系，开展水稻穗腐病菌的发生发展规律、病原菌定殖方式、品种抗性鉴定等提供技术支持。同时发现采用稻谷培养进行人工接种层出镰刀菌更利于伏马菌素的合成，结合已有的伏马菌素的测定方法，我们可以精确稳定地分析不同菌株之间伏马菌素合成能力的差异，为今后深入研究层出镰刀菌伏马菌素合成相关基因功能奠定基础。

参考文献：

[1] Huang S W, Wang L, Liu L M, Tang S Q, Zhu D F, Savary S. Rice spikelet rot disease in China: I. Characterization of fungi associated with the disease. *Crop Prot*, 2011, 30(1): 1-9.

[2] Jiang Y, Chen Z, Guangren X U. Research progress of fumonisin toxicity in pigs. *China Feed*, 2016.

[3] Rheeder J P, Wfo M, Thiel P G, Sydenham E W, Shephard G S, Van Schalkwyk D J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 1992, 82(3): 353-357.

- [4] Shephard G S. Dietary fumonisin exposure in a rural population of South Africa. *Food Chem Tox*, 2010, 48(8/9): 2103-2108.
- [5] Huang S W, Wang L, Liu L M, Tang S Q, Zhu D F, Savary S. Rice spikelet rot disease in China: II. Pathogenicity tests, assessment of the importance of the disease, and preliminary evaluation of control options. *Crop Prot*, 2011, 30(1): 10-17.
- [6] Woloshuk C P, Shim W B. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: A convergence of knowledge. *Fems Microbiol Rev*, 2013, 37(1): 94-109.
- [7] Rheeder J P, Marasas W F O, Vismer H F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(5): 2101-2105.
- [8] Nelson P E, Desjardins A E, Plattner R D. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* Species: Biology, chemistry, and significance. *Ann Rev Phytopathol*, 1993, 31(1): 233-252.
- [9] Marin S, Sanchis V, Ramos A J, Vinas I, Magan N. Environmental factors, *in vitro* interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycol Res*, 1998, 102(7): 831-837.
- [10] Marín S, Magan N, Serra J, Ramos A J, Canela R, Sanchis V. Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. *J Food Sci*, 2010, 64(5): 921-924.
- [11] 李正翔, 陈小龙, 曹赵云, 曹晓林, 巩佳第, 朱智伟. 液相色谱-串联质谱法测定粮谷中的伏马毒素. 分析测试学报, 2014, 339(2), 167-172.
Li Z X, Chen X L, Cao Z Y, Cao X L, Gong J D, Zhu Z W. Determination of fumonisins in cereals using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Instru Anal*, 2014, 339(2), 167-172.
- [12] Zhang X, Zhou M, Ren L J, Bai G H, Ma H X, Scholten O E. Molecular characterization of *Fusarium* head blight resistance from wheat variety Wangshuibai. *Euphytica*, 2004, 139(1): 59-64.
- [13] Bai G, Shaner G. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight1. *Ann Rev Phytopathol*, 2004, 42(1): 135-161.
- [14] Ban T, Suenaga K. Genetic analysis of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum* in Chinese wheat cultivar Sumai 3 and the Japanese cultivar Saikai 165. *Euphytica*, 2000, 113(2): 87-99.
- [15] Boenisch M J, Schäfer W. *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *Bmc Plant Biol*, 2011, 11(1): 110-110.
- [16] Tang Y X, Jin J, Hu D W, Yong M L, Xu Y, He L P. Elucidation of the infection process of *Ustilaginoidea virens* (teleomorph: *Villosiclava virens*) in rice spikelets. *Plant Pathol*, 2013, 62(1): 1-8.
- [17] Fan J, Yang J, Wang Y Q, Li G B, Li Y, Huang F, Wang W M. Current understanding on *Villosiclava virens*, a unique flower-infecting fungus causing rice false smut disease. *Mol Plant Pathol*, 2015, 17(9): 1321-1330.
- [18] Hu M, Luo L, Wang S, Liu Y, Li J. Infection processes of *Ustilaginoidea virens*, during artificial inoculation of rice panicles. *Eur J Plant Pathol*, 2014, 139(1): 67-77.
- [19] Bluhm B H, Woloshuk C P. Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Mol Plant Mic Interact*, 2005, 18(12): 1333-1339.
- [20] Bluhm B H, Woloshuk C P. Fck1, a C-type cyclin-dependent kinase, interacts with Fcc1 to regulate development and secondary metabolism in *Fusarium verticillioides*. *Fun Genet & Biol*, 2006, 43(3): 146-154.
- [21] Bluhm B H, Flaherty J E, Cousin M A, Woloshuk C P. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *J Food Prot*, 2002, 65(12): 1955-1961.
- [22] Keller S E, Sullivan T M, Chirtel S. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum*, and the production of fumonisin B1 : Oxygen and pH. *J Indus Microbiol & Biotechnol*, 1997, 19(4): 305-309.
- [23] Shim W B, Woloshuk C P. Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Fems Microbiol Lett*, 1999, 177(1): 109-116.
- [24] Shim W B, Flaherty J E, Woloshuk C P. Comparison of fumonisin B1 biosynthesis in maize germ and degermed kernels by *Fusarium verticillioides*. *J Food Prot*, 2003, 66(11): 2116-2122.
- [25] Shim W B, Woloshuk C P. Regulation of Fumonisin B1 Biosynthesis and Conidiation in *Fusarium verticillioides* by a Cyclin-Like (C-Type) Gene, FCC1. *Appl & Environ Microbiol*, 2001, 67(4): 1607-1612.
- [26] Flaherty J E, Woloshuk C P. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, ZFR1. *Appl & Environ Microbiol*, 2004, 70(5): 2653-2659.
- [27] Flaherty J E, Pirttilä A M, Bluhm B H. PAC1, a pH-Regulatory Gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl & Environ Microbiol*, 2003, 69(9): 5222-5227.
- [28] Bluhm B H, Kim H, Rae B, Woloshuk C P. Involvement of ZFR1 of *Fusarium verticillioides* in kernel colonization and the regulation of FST1, a putative sugar transporter gene required for fumonisin biosynthesis on maize kernels. *Mole Plant Pathol*, 2010, 9(2): 203-211.