

研究报告



贵州玉米籽粒镰刀菌污染情况调查

尚国富^{Δ1,3} 于欢^{Δ1,3} 赵雪^{1,4} 夏雪^{1,3} 刘江丽^{1,3} 彭晓燕^{2,3} 曾柱^{1,2,4} 胡祖权^{*1,2,3}

1 贵州省免疫细胞与抗体工程研究中心 贵州医科大学生物与医学工程重点实验室 贵州 贵阳 550025

2 环境污染与疾病监控省部共建教育部重点实验室(贵州医科大学) 贵州 贵阳 550025

3 贵州医科大学生物与工程学院 贵州 贵阳 550025

4 贵州医科大学基础医学院 贵州 贵阳 550025

摘要:【背景】镰刀菌引起的作物病害在贵州省内时有发生,由于该地区低温高湿的气候特征并不适宜镰刀菌生长,之前未系统开展镰刀菌侵染和分布情况调查。【目的】调查贵州省玉米籽粒中镰刀菌病害的污染情况。【方法】收集贵州省58个县/县级市的玉米籽粒样品78份,利用原核表达的可用于检测镰刀菌的FvSG7-AP融合蛋白对样品进行快速免疫学检测,并对部分样品进行生物学培养鉴定。【结果】共有67份样品检测结果为阳性,污染率高达85.90%,生物学培养后显微镜观察到镰刀菌菌丝和孢子。检测出镰刀菌污染的玉米样品分布在贵州省51个县/县级市,其中19个地区检测到轻度污染样品,20个地区检测到中度污染样品,12个地区检测到重度污染样品。【结论】贵州省绝大部分地区存在不同程度的镰刀菌污染,有必要在作物耕种、收获及贮藏期间采取有效的防控措施,以保障食品安全与人畜健康。

关键词: 镰刀菌, 真菌污染, 单链抗体, 融合蛋白, 快速免疫学检测

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31660258); 2011 Collaborative Innovation Program of Guizhou Province (2015-04); Science and Technology Innovative Talent Team of Guizhou Province (2015-4021); Opening Project of Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education (Guizhou Medical University) (KY-2017-380); Cell and Gene Engineering Innovative Research Groups of Guizhou Province (KY-2016-031); National Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship (201510660001)

ΔThese authors contributed equally to this work

*Corresponding author: E-mail: huzuquan@gmc.edu.cn

Received: 23-03-2018; Accepted: 08-06-2018; Published online: 11-07-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31660258); 2011 协同创新中心(黔教合协同创新字[2015]04); 贵州省科技创新人才团队项目(黔科合人才团队[2015]4021); 贵州医科大学环境污染与疾病监控省部共建教育部重点实验室开放课题基金(黔教合 KY 字[2017]380); 贵州省细胞与基因工程创新群体(黔教合 KY 字[2016]031); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201510660001)

Δ共同第一作者

*通信作者: E-mail: huzuquan@gmc.edu.cn

收稿日期: 2018-03-23; 接受日期: 2018-06-08; 网络首发日期: 2018-07-11

Investigation of *Fusarium* contamination in maize kernels from Guizhou Province

SHANG Guo-Fu^{Δ1,3} YU Huan^{Δ1,3} ZHAO Xue^{1,4} XIA Xue^{1,3} LIU Jiang-Li^{1,3}
PENG Xiao-Yan^{2,3} ZENG Zhu^{1,2,4} HU Zu-Quan^{*1,2,3}

1 Immune Cells and Antibody Engineering Research Center of Guizhou Province, Key Laboratory of Biology and Medical Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China

2 Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China

3 School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China

4 School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: [Background] The crop diseases caused by *Fusarium* spp. are a frequent occurrence in Guizhou Province. As the climate characteristics of low temperature and high humidity in this region are not suitable for the mycelial growth of *Fusarium* pathogens, the infection and distribution of *Fusarium* have not been systematically investigated before. **[Objective]** To investigate the contamination of *Fusarium* spp. in the maize kernels collected from Guizhou Province. **[Methods]** Seventy-eight maize samples from 58 counties or county-level cities were collected and subjected to rapid immunoassay using prokaryotic expressed FvSG7-AP fusion protein that can be used to detect the presence of *Fusarium* pathogens in cereal grains. At the same time, biological culture tests were performed on some samples for further identification. **[Results]** A total of 67 samples were ascertained to be positive and the contamination rate was as high as 85.90%. The typical *Fusarium* mycelium and conidiospores were observed under microscope after biological culture. The *Fusarium* contaminated maize samples were distributed in 51 counties or county-level cities in Guizhou Province. Among them, mildly contaminated samples were detected in 19 regions, moderately contaminated samples were detected in 20 regions, and heavily contaminated samples were detected in 12 regions. **[Conclusion]** There are different degrees of *Fusarium* contamination in most parts of Guizhou. It is necessary to take effective prevention and control measures during the cultivation, harvesting and storage of crops to ensure food safety and human and animal health.

Keywords: *Fusarium*, Fungal contamination, Single-chain variable fragment, Fusion protein, Rapid immunoassay

镰刀菌是一类重要的植物病原真菌,由其引起的小麦、玉米、水稻等作物的种腐、苗腐、茎腐和穗腐等病害严重影响植物的生长发育状况及产品质量,对世界各国的粮食生产造成了重大的危害。此外,镰刀菌还可产生多种真菌毒素污染粮食及饲料,包括伏马菌素(Fumonisin, FBs)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)、雪腐镰刀菌烯醇(Nivalenol, NIV)等,这些毒素不易降解,经食物链传递至动物或人体内,对人类的健康造成严重威胁^[1-2]。在我国,镰刀菌常常出现在长江中下游流域的高湿高热地区,同时也是东北平原、华北平原和四川盆地

的小麦、玉米种植区的主要病害之一,对我国的粮食生产已构成了极大的威胁^[3-5]。贵州属于高原山地,气温相对较低,不属于传统的镰刀菌流行区,研究人员对该地区镰刀菌发病情况的研究和报道极少。近年来,一些研究发现镰刀菌在该地区引起玉米穗腐病、半夏块茎腐烂病、烟草根腐病等植物病害^[6-8]。因此,对贵州省的镰刀菌病害进行系统的分布情况调查,将有利于粮食作物、中药材和烟草等在田间生产和仓储过程中采取适当的防治措施,防止镰刀菌及其毒素的污染,在保障食品安全方面具有重要意义,也将为后续分离高原山地的镰刀菌优势种群以及鉴定毒素的化学型等奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

玉米籽粒样品来源于贵州省内 9 个地区, 涵盖贵州省 58 个县/县级市, 共计 78 份。保存的重组菌株 XL1-Blue/pDAP2/S-FvSG7 为胡祖权分离的抗镰刀菌单链抗体(Single-chain variable fragment, scFv)基因 *FvSG7* (GenBank 登录号: KC304795) 通过重叠延伸 PCR (Splicing by overhang extension-polymerase chain reaction, SOE-PCR) 在 3' 端添加 218 连接肽^[9]后, 利用 *Sfi* I 和 *Not* I 酶切位点克隆到含有碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AP) 基因的 pDAP2/S 载体中, 构建含有 *FvSG7-AP* 融合基因的重组质粒 pDAP2/S-FvSG7, 转化大肠杆菌 XL1-Blue 感受态细胞后获得^[10]。

1.2 主要试剂和仪器

Tryptone、Yeast extract, Oxoid 公司; 脱脂奶粉, 武汉博士德生物工程有限公司; 琼脂糖, 上海玉博生物科技有限公司; 对硝基苯磷酸二钠(p-Nitrophenyl phosphate, pNPP), 上海 Sigma-Aldrich 公司; 氨苄青霉素(Amp)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG), 北京索莱宝科技有限公司; Ni-NTA 基质, 凯杰企业管理(上海)有限公司; Brandford 蛋白浓度测定试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。全温振荡摇床, 太仓市华美生化仪器厂; 超声波破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 离心机, LaboGene 公司; 酶标仪, BioTek 仪器有限公司; 显微镜, 奥林巴斯有限公司。

1.3 培养基和缓冲液

2TY 培养基(g/L): Tryptone 16.0, Yeast extract 10.0、NaCl 10.0, pH 7.0; PDA 培养基(g/L): 马铃薯浸出液 200.0、葡萄糖 20.0、琼脂粉 15.0; 磷酸盐缓冲液(PBS) (g/L): NaCl 8.0, KCl 0.2, Na₂HPO₄ 1.44, KH₂PO₄ 0.24, pH 7.2–7.4; PBST(0.05)溶液: 含 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液; PBST(0.1)溶液:

含 0.1% Tween-20 的 PBS 溶液; pNPP 显色液: 含 2.00 g/L pNPP 的溶液。

1.4 FvSG7-AP 融合蛋白诱导表达

取 20 μ L 甘油保存的重组菌株 XL1-Blue/pDAP2/S-FvSG7 接种于 20 mL 含 100 μ g/mL Amp 的 2TY 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜后, 取 10 mL 菌液接种至 200 mL 含 100 μ g/mL Amp 的 2TY 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.5–0.6 时, 加入终浓度 0.1 mmol/L IPTG, 置恒温摇床 16 °C、200 r/min 诱导表达 20 h^[11]。超声波破碎法提取 FvSG7-AP 融合蛋白, 12 000 r/min 离心, 取菌液上清液倍比稀释后, 加入 100 μ L pNPP 显色液, 读取 OD_{405} 检测融合蛋白的表达情况及表达形式^[11]。Ni-NTA 基质纯化融合蛋白, Brandford 法测定其浓度。

1.5 酶联免疫(ELISA)检测样品

研磨玉米籽粒, 称取 0.2 g 样品装入离心管中, 加入 1 mL PBST(0.05), 翻转摇匀 2 h, 静置 10 min 后取 100 μ L 上清至 ELISA 板孔中, 37 °C 水浴包被 2 h, 用 PBS 洗涤 3 次; 然后加入 150 μ L 封闭液(含 20.0 g/L 脱脂奶粉的 PBS 溶液), 37 °C 水浴 2 h, 用 PBS 洗涤 3 次; 接着, 加入 100 μ L FvSG7-AP 溶液, 37 °C 反应 1.5 h, 用 PBST 和 PBS 分别洗涤 3 次; 最后加入 100 μ L pNPP 显色液, 黑暗条件下反应 40 min, 酶标仪读取 OD_{405} 数值。健康玉米和 PBS 分别作阴性对照和空白对照, 每个样品重复 3 次。计算实验样品读值与阴性对照读值的比值 $n = (\text{样品 } OD_{405} - \text{空白对照 } OD_{405}) / (\text{阴性对照 } OD_{405} - \text{空白对照 } OD_{405})$ 。

1.6 形态学显微鉴定

挑选 10 份玉米籽粒样品, 放入 70% 酒精中浸泡 30 s, 用无菌水清洗 3 次, 然后用 2% 次氯酸钠溶液浸泡 2 min, 用无菌水清洗 5 次^[7]。随后, 接种于 PDA 固体培养基上, 28 °C 恒温培养 3–5 d, 待菌落快布满整个培养皿时, 根据菌丝形态和颜色挑取边缘菌丝转接至新鲜的 PDA 培养基上继续培

养, 经 3-4 次转接后, 挑取少量菌丝涂布于载玻片上, 显微镜观察菌丝和孢子的形态。

2 结果与分析

2.1 FvSG7-AP 融合蛋白表达及活性检测

FvSG7-AP 融合蛋白结构模型如图 1A 所示, 抗镰刀菌单链抗体 FvSG7 与碱性磷酸酶通过 218 连接肽^[9]连接, 并可利用 C 端的 His 标签纯化融合蛋白。由于 scFv-AP 融合蛋白不仅具有单链抗体的特异抗原结合特性, 而且其中的碱性磷酸酶能够直接催化 pNPP 底物显色, 因此, 通过操作简单的 AP 显色反应可快速有效地判断融合蛋白的表达情况及表达形式, 即在诱导重组大肠杆菌表达后提取菌液上清, 加入 pNPP 溶液观察显色情况^[11]。图 1B 显示本实验按照优化的原核表达条件在菌液上清中获得了大量可溶性的 FvSG7-AP 融合蛋白, 可开展下一步蛋白纯化以及样品检测的研究。SDS-PAGE 检测显示纯化的 FvSG7-AP 融合蛋白在约 80 kD 大小的位置有单一的蛋白条带(图 1C), 蛋白浓度达到 436 ng/ μ L。

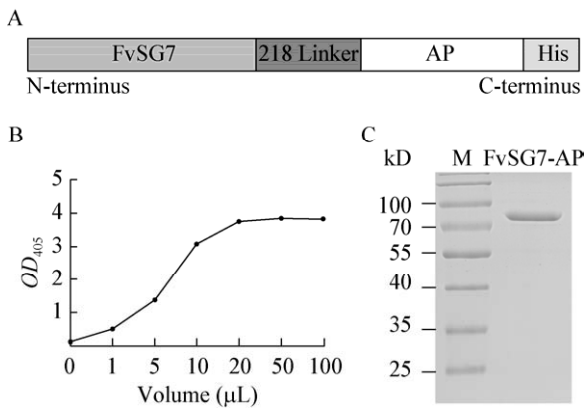


图 1 FvSG7-AP 融合蛋白的原核表达及检测

Figure 1 Prokaryotic expression and detection of FvSG7-AP fusion protein

注: A: FvSG7-AP 融合蛋白的结构模式图; B: AP 显色检测融合蛋白的活性; C: 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测图; M: 蛋白分子量标准。

Note: A: Structure pattern of FvSG7-AP fusion; B: Activity of fusion protein detected by AP coloration; C: SDS-PAGE detection of fusion protein; M: Protein molecular weight standards.

2.2 ELISA 检测玉米籽粒样品

玉米籽粒样品研磨处理后, 经 ELISA 进行快速免疫检测。如图 2 所示, 78 份样品中仅 8 份 (10.26%) 未检测出镰刀菌, 污染水平为轻度的样品有 28 份 (35.90%), 中度污染的样品有 24 份 (30.77%), 而达到重度或极重度污染的样品分别为 6 份 (7.69%) 和 9 份 (11.54%), 另有 3 份 (3.84%) 样品检测时有显色反应, 但与健康玉米相比 OD_{405} 比值未达到 2 倍, 归为疑似污染样品。因此, 在贵州省内采集的玉米籽粒样品的污染率超过 85%。

2.3 贵州省镰刀菌的污染分布情况

贵州省介于东经 $103^{\circ}36'-109^{\circ}35'$ 、北纬 $24^{\circ}37'-29^{\circ}13'$ 之间, 根据玉米籽粒的采集点对镰刀菌的污染情况在贵州省地图上进行标注(图 3)。结果显示, 在采集到样品的 58 个县/县级市中, 轻度污染区占 32.76% (19 个), 中度污染区占 34.48% (20 个), 重度污染水平以上的地区占 20.69% (12 个), 同时另有 2 个 (3.45%) 疑似污染区。因此, 贵州省大约 90% 的县/县级市检测出有镰刀菌污染, 而且分布非常广泛, 几乎遍布全省。

2.4 镰刀菌形态学观察

选取 3 份取自水城、晴隆县和安顺市西秀区的极重度污染样品, 2 份取自黎平县和铜仁市碧江区的中度污染样品, 2 份取自罗甸县和丹寨县的轻度污染样品, 1 份取自务川县的疑似污染样品, 2 份取自都匀市和麻江县的无污染样品, 通过 70% 酒精和 2% 次氯酸钠溶液对玉米籽粒的表面进行灭菌处理后, 接种于 PDA 固体培养基上培养。结果如图 4A 所示, 除 2 份无污染样品外, 培养长出的内生真菌菌丝具有镰刀菌的形态特征, 而且疑似污染样品中也证实存在镰刀菌污染。挑取边缘菌丝转接纯化, 培养 3 d 后形成圆形菌斑, 气生菌丝棉絮状、正面白色(图 4B), 背面呈黄褐色(图 4C)。将菌丝涂布于载玻片, 观察菌丝和孢子的形态特征, 显示菌丝有隔和分枝, 分生孢子有镰刀状、纺锤形等典型特征(图 4D-F)。

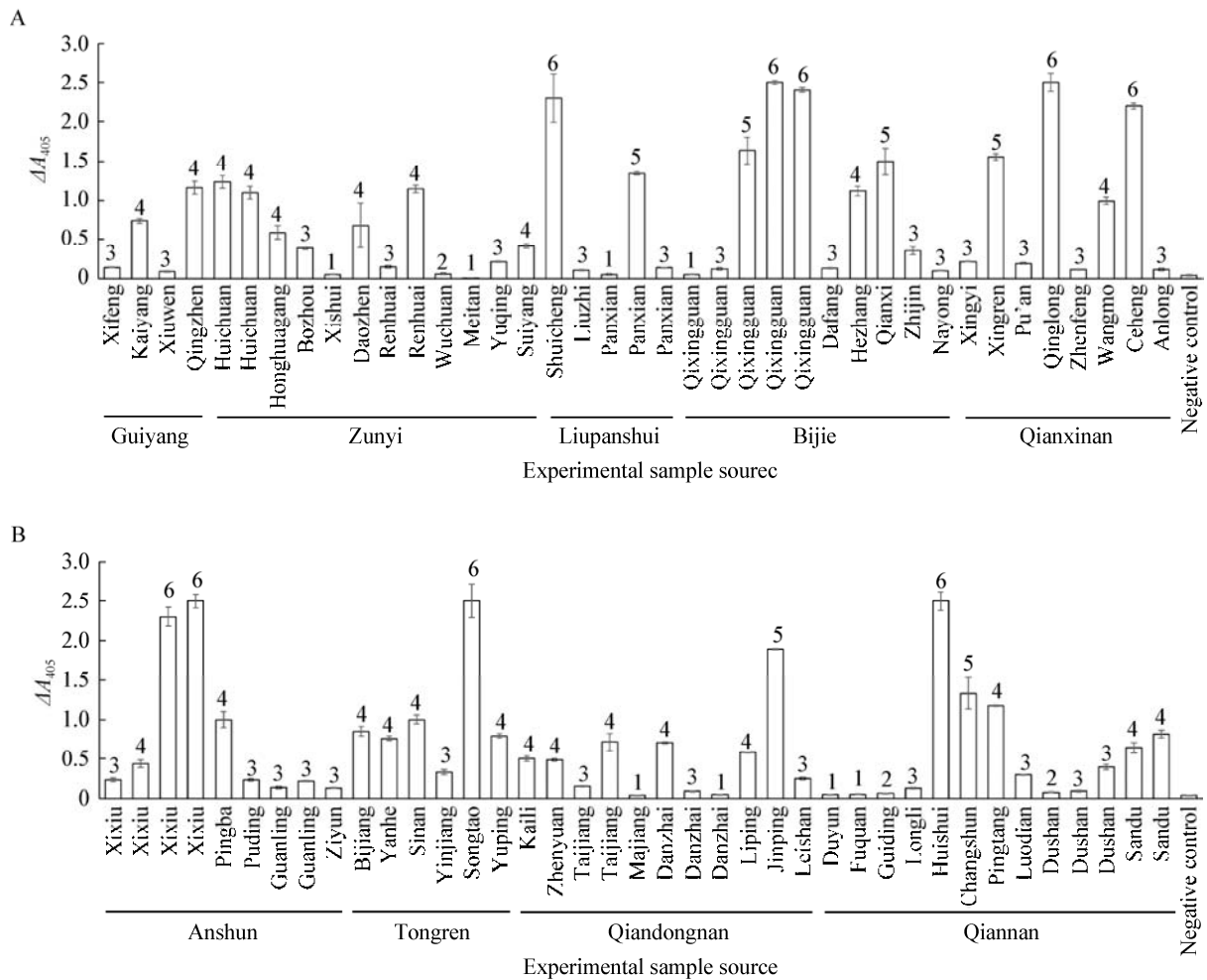


图 2 ELISA 检测玉米籽粒样品的镰刀菌污染情况

Figure 2 ELISA detection for investigation of *Fusarium* contamination in maize kernels

注: 1: $n < 1.5$, 样品无污染; 2: $1.5 \leq n < 2$, 疑似污染样品; 3: $2 \leq n < 10$, 轻度污染样品; 4: $10 \leq n < 30$, 中度污染样品; 5: $30 \leq n < 50$, 重度污染样品; 6: $n \geq 50$, 极重度污染样品; $n = (\text{样品 } OD_{405} - \text{空白对照 } OD_{405}) / (\text{阴性对照 } OD_{405} - \text{空白对照 } OD_{405})$.

Note: 1: $n < 1.5$, No contamination for samples; 2: $1.5 \leq n < 2$, Suspected contaminated samples; 3: $2 \leq n < 10$, Mildly contaminated samples; 4: $10 \leq n < 30$, Moderately contaminated samples; 5: $30 \leq n < 50$, Severely contaminated samples; 6: $n \geq 50$, Extremely severe contaminated samples; $n = (OD_{405} \text{ value of sample} - OD_{405} \text{ value of blank control}) / (OD_{405} \text{ value of negative control} - OD_{405} \text{ value of blank control})$.

3 讨论与结论

病原真菌及其毒素的污染源和分布、毒素形成过程及其分子调控机制、产毒菌类群和毒素化学型与生态环境的相关性、脱毒及毒性机理、检验检疫和检测技术、污染防控等一直是国内外的研究重点^[5-8,10,12-15], 受到社会的广泛关注。贵州地处云贵高原, 属中国亚热带高原季风湿润气候, 湿度较大, 气温较低且不稳定, 不属于典型的镰刀菌流

行病区域, 未有该菌引起大面积严重病害的报道。Samapundo 等研究发现, 镰刀菌在高水活性和高温 (30 °C) 时表现为菌丝快速生长, 而产毒的最佳温度却是 15–25 °C^[16], 这使得镰刀菌对作物的侵染常常表现为无病症而产毒量反而更高的现象^[17]。贵州地区的气候虽不适宜镰刀菌快速繁殖, 但非常适合毒素的产生, 因此, 镰刀菌及其毒素污染的状况需引起足够的重视。

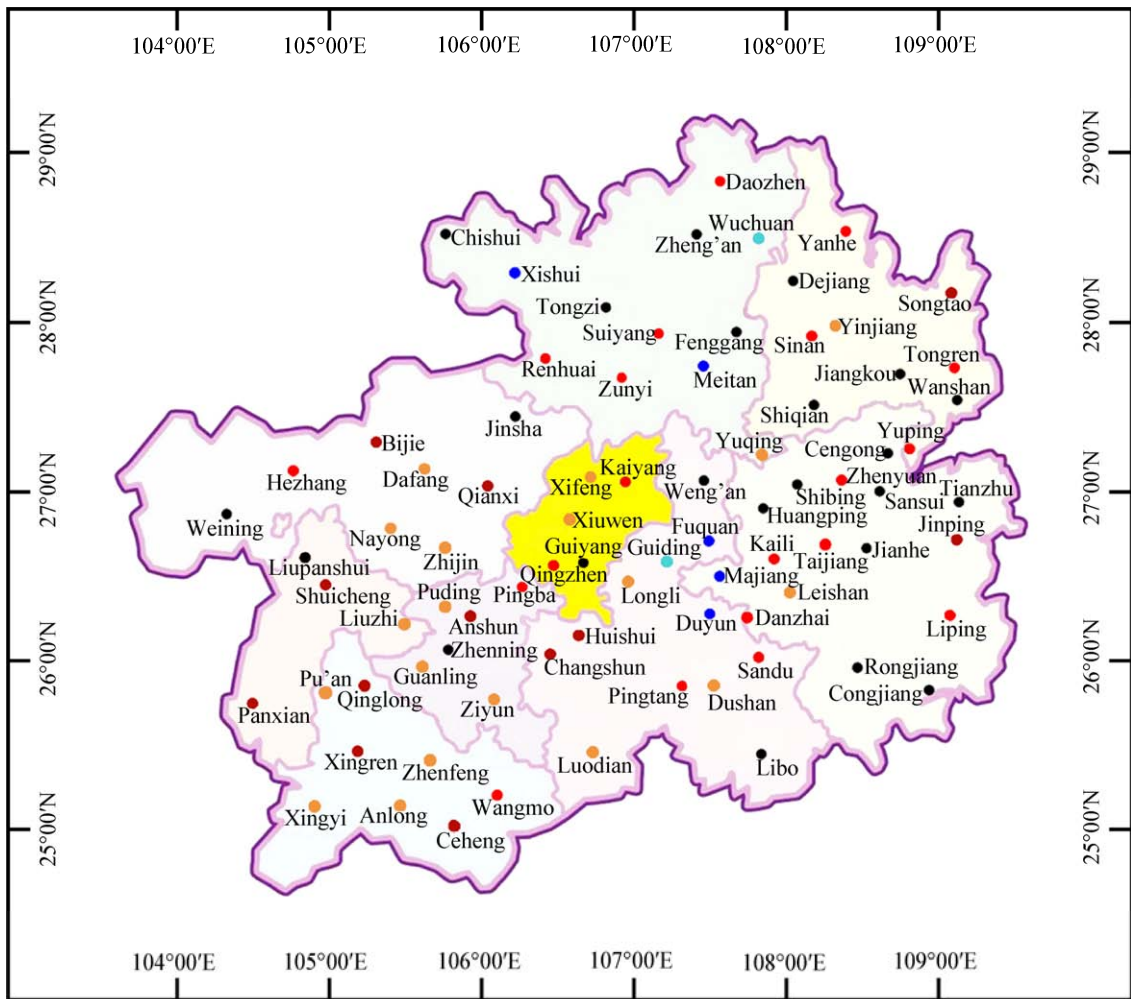


图3 贵州省镰刀菌污染的分布情况

Figure 3 Distribution of *Fusarium* contamination in Guizhou Province

注: ●: 未采集到玉米样品的区域; ●: 样品未检测到镰刀菌的地区; ●: 样品疑似有镰刀菌污染的地区; ●: 样品有镰刀菌轻度污染的地区; ●: 样品有镰刀菌中度污染的地区; ●: 样品有镰刀菌重度和极重度污染的地区。

Note: ●: No maize sample collected; ●: The samples without *Fusarium* detected in these regions; ●: The samples with suspected contamination in these regions; ●: The samples with mild contamination in these regions; ●: The samples with moderate contamination in these regions; ●: The samples with severe and extreme contamination in these regions.

贵州喀斯特高原山区良好的土壤和气候环境,使得该地区成为全国四大中药材产地之一,也是全国优质烟叶和茶叶的生产基地。镰刀菌对这些经济作物都存在不同程度的侵染,有时还是茎腐病和根腐病的主要病原真菌^[7-8,18-19]。而且,Wang 等从贵州省玉米籽粒中分离到 *Fusarium temperatum*^[6],该菌株首次由 Scaufaire 等从比利时玉米样品中分离得到^[20],在世界范围内的报道

一直较少,Wang 等发现的 *F. temperatum* 在中国乃至亚洲为首次报道^[6]。因此,对贵州省内镰刀菌的侵染和分布情况进行全面的调查和了解,将为保障粮食、饲料和经济作物的安全生产提供指导,还可进一步分离贵州镰刀菌菌株进行表型和分子鉴定,分析比较其产毒特性,有可能发现新的镰刀菌种或亚种,同时可扩展镰刀菌生物多样性的资源。

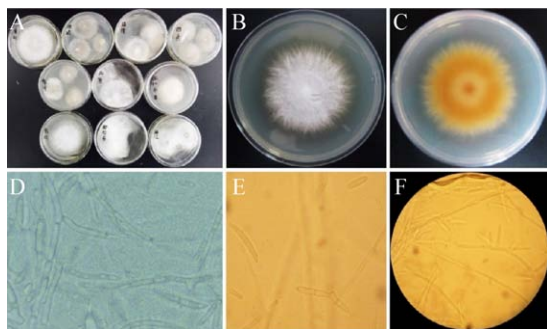


图4 镰刀菌培养及形态学观察

Figure 4 Culture and morphological observation of *Fusarium* pathogens

注: A-C: 污染玉米籽粒在 PDA 培养基平板上培养纯化镰刀菌; D-F: 显微镜观察菌丝和孢子形态。

Note: A-C: Culture and purification of *Fusarium* by inoculating contaminated maize kernels on PDA medium plates; D-F: The morphology of mycelia and conidiospores observed under microscope.

FvSG7 是通过噬菌体展示技术从鸡源抗体库中筛选得到的单链抗体, 可与镰刀菌菌丝和孢子表面的细胞壁结合蛋白(Cell wall-bound proteins, CWPs)特异性结合; FvSG7-AP 则是 FvSG7 单链抗体与 AP 通过 218 连接肽连接形成的融合蛋白 ($K_D=3.69 \times 10^{-8}$ mol/L), 对玉米籽粒中镰刀菌菌丝的检测限达到 10^{-2} $\mu\text{g/mL}$, 可用于玉米和小麦等镰刀菌污染情况的快速检测^[10]。本实验在前期优化的 scFv-AP 融合蛋白构建方式以及表达条件^[11]的基础上, 大量表达可溶性 FvSG7-AP 融合蛋白, 对贵州省内 58 个县/县级市收集的 78 份玉米籽粒进行快速免疫检测, 结果显示样品中镰刀菌的检出率超过 85%, 分别有 7.69% (6 份)和 11.54% (9 份)的样品达到重度或极重度污染水平(图 2), 仅 5 个县/县级市的样品未检测到镰刀菌污染, 分布极其广泛(图 3)。取 10 份玉米籽粒样品在 PDA 固体培养基上接种后进行生物学检测时, 观察到 ELISA 检测为阳性的样品都有镰刀菌菌丝长出, 并证实疑似污染样品中也存在镰刀菌污染, 有些样品还存在曲霉菌和细菌等病原菌污染。总之, 贵州省的镰刀菌污染状况不容乐观, 加强对镰刀菌及其产毒情况的调研和监控, 在玉米、中药材、烟叶和茶叶

等粮食或经济作物耕种、收获及贮藏期间采取有效的防治措施, 对于保障食品安全和人畜健康具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Sun XD, Su P, Shan H. Mycotoxin contamination of rice in China[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(3): 573-584
- [2] Lee HJ, Ryu D. Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food products: public health perspectives of their co-occurrence[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(33): 7034-7051
- [3] Gong HZ, Ji R, Li YX, et al. Occurrence of fumonisin B₁ in corn from the main corn-producing areas of china[J]. Mycopathologia, 2009, 167: 31-36
- [4] Qiu J, Shi J. Genetic relationships, carbendazim sensitivity and mycotoxin production of the *Fusarium graminearum* populations from maize, wheat and rice in eastern China[J]. Toxins (Basel), 2014, 6(8): 2291-2309
- [5] Zhang JB, Li HP, Dang FJ, 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(8): 967-975
- [6] Wang JH, Zhang JB, Li HP, et al. Molecular identification, mycotoxin production and comparative pathogenicity of *Fusarium temperatum* isolated from maize in China[J]. Journal of Phytopathology, 2013, 162(3): 147-157
- [7] Shi JL, Li YQ, Hu KM, et al. Isolation and identification of pathogens from rotted root of *Pinellia ternata* in Guizhou province[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 289-299 (in Chinese)
石建龙, 李玉权, 胡琨敏, 等. 贵州半夏块茎腐烂病原菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 289-299
- [8] Sang WJ, Zhu, ML, Wu XL, et al. A preliminary report of tobacco root rot caused by *Fusarium* sp.[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 1998, 17(3): 140-141 (in Chinese)
桑维钧, 祝明亮, 吴兴禄, 等. 烟草镰刀菌根腐病研究初报[J]. 山地农业生物学报, 1998, 17(3): 140-141
- [9] Whitlow M, Bell BA, Feng SL, et al. An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability[J]. Protein Engineering, 1993, 6(8): 989-995
- [10] Hu ZQ, Li HP, Zhang JB, et al. A phage-displayed chicken single-chain antibody fused to alkaline phosphatase detects *Fusarium* pathogens and their presence in cereal grains[J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 764: 84-92
- [11] Wang Y, Zhou J, Liu LN, et al. Activity analysis of fusion proteins containing different types of scFv antibody and alkaline phosphatase[J]. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(8): 1798-1803 (in Chinese)
王贇, 周静, 刘丽娜, 等. 不同方式构建的单链抗体-碱性磷酸酶融合蛋白的活性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(8): 1798-1803
- [12] Hu ZQ, Li HP, Wu P, et al. An affinity improved single-chain

- antibody from phage display of a library derived from monoclonal antibodies detects fumonisins by immunoassay[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 867: 74-82
- [13] Xue S, Li HP, Zhang JB, et al. Chicken single-chain antibody fused to alkaline phosphatase detects *Aspergillus* pathogens and their presence in natural samples by direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(22): 10992-10999
- [14] Zhou J, Zhao X, Xia X, et al. Gene cloning and prokaryotic expression of the cell wall protein AFLMP1 of *Aspergillus flavus*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(11): 3054-3059 (in Chinese)
周静, 赵雪, 夏雪, 等. 黄曲霉细胞壁蛋白 AFLMP1 的基因克隆与原核表达[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(11): 3054-3059
- [15] Liu JL, Hu ZQ, Li HP, et al. Screening and identification of the mimic epitope of the cell wall proteins of *Fusarium*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(2): 235-240 (in Chinese)
刘锦龙, 胡祖权, 李和平, 等. 镰刀菌细胞壁蛋白抗原模拟表位的筛选和鉴定[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(2): 235-240
- [16] Samapundo S, Devlieghere F, De Meulenaer B, et al. Effect of water activity and temperature on growth and the relationship between fumonisin production and the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on corn[J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(5): 1054-1059
- [17] Munkvold GP, Desjardins AE. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence?[J]. *Plant Disease*, 1997, 81(6): 556-565
- [18] Sang WJ, Lian QX, Song BA, et al. Investigation of kinds of fungus diseases for *Atractylodes macrocephala* Koidz and their control measures in Guizhou[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2006, 34(3): 40-41 (in Chinese)
桑维钧, 练启仙, 宋宝安, 等. 贵州省白术真菌病害种类调查及防治[J]. *贵州农业科学*, 2006, 34(3): 40-41
- [19] Zhou LY, Wang YJ, Huang AP, et al. Identification of a *Fusarium* pathogenic fungus from tea[C]. 2013 Academic Annual Meeting of the Hunan Tea Society, 2013: 146-150 (in Chinese)
周凌云, 王沅江, 黄安平, 等. 一种茶叶镰刀菌属病原真菌的鉴定[C]. 湖南省茶叶学会 2013 年学术年会, 2013: 146-150
- [20] Scauflaire J, Gourgue M, Munaut F. *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*[J]. *Mycologia*, 2011, 103(3): 586-597