

苏媛,刘雪静,尹宝重,等. 利用枯萎病菌毒素筛选草莓枯萎病抗性突变体[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):158-161.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.048

利用枯萎病菌毒素筛选草莓枯萎病抗性突变体

苏媛^{1,2}, 刘雪静³, 尹宝重^{1,2}, 甄文超^{1,2}

(1. 河北农业大学植物保护学院,河北保定 071001;2. 河北省农作物病虫害生物防治工程中心,河北保定 071001;
3. 中国科学院唐山高新技术研究与转化中心,河北唐山 063000)

摘要:以丰香、童子一号、全明星、森格那、达赛莱克特 5 个品种草莓组培苗为试材,以草莓枯萎病菌毒素作为选择压力,筛选草莓抗枯萎病突变体,对突变体再生植株与野生型植株的生长、分化进行鉴定。结果表明,草莓枯萎病菌毒素对植株和茎尖生长点均有较强的毒害作用,经粗毒素处理的植株可产生与枯萎病相似的症状。在毒素含量为 10% 的条件下继代培养 3 次后,丰香品种的存活率上升最显著;于毒素含量为 15% 的培养基继代培养 3 次后,森格那、全明星品种的存活率上升最显著。在 15% 毒素浓度下,继代 3 次培养的草莓抗性不定芽存活率均不同程度低于 10% 毒素浓度,其中下降幅度最小的是全明星品种,仅为 7.6%。在含有毒素的培养基上培养,AS-1、TZ-1 抗性不定芽分化最为稳定,分别比同品种的野生型不定芽高 49.61%、50.38%;可见,在含有毒素的培养基上继代培养可提高不定芽对毒素的抗性。抗病性鉴定结果表明,突变体再生植株对枯萎病菌的抗性高于野生型再生植株。选用 OPP-18 特异性引物对 TZ-1 与童子一号品种进行 RAPD 分析,电泳结果显示,在 750~1 000 bp 之间存在特异性条带;选用 OPO-05 引物对其进行筛选,扩增出清晰可辨的 3 条非特异性条带,表明所获得的抗性植株与野生型植株在基因水平上发生了改变,可被认定为突变体。

关键词:枯萎病菌毒素;草莓;枯萎病;抗性不定芽;筛选;RAPD 分析

中图分类号:S436.68⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0158-04

草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)属于蔷薇科草莓属,在果树生产中占有重要地位。目前,中国草莓栽培面积、产量分别约为 13.5 万 hm²、200 万 t,均居世界首位。中国草莓产区广泛采用设施栽培,并由于耕地数量的限制,使连作面积不断上升。连作草莓生长发育不良、土传根部病害均日趋严重,被称为连作障碍^[1-2]。草莓枯萎病是一种由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *fragariae*)侵染引起的真菌病害,对草

莓的生长和产量造成很大影响,而连作障碍会显著增加草莓枯萎病的发生。调查发现,未经土壤消毒处理地块的草莓第 2 年连作枯萎病发病率达 90%,减产超过 20%;第 3 年连作发病率达 100%,减产超过 40%^[3]。目前,对草莓连作障碍的防治大多采用种植前的土壤消毒,常用化学药剂有溴甲烷、氯化苦、棉隆、威百亩等。化学药剂效果明显,但均存在不同程度的毒性大、污染环境、操作技术严格等问题。

植物病原菌毒素是植物病原菌产生的对寄主植物具有毒性的代谢产物,是导致植物病害发生的主要原因之一^[4-5]。离体条件下筛选植物抗病突变体,是结合植物组织培养技术,应用病菌毒素或类似毒素的化学物质在细胞水平上选择抗病突变体,是高等植物抗病育种的一种尝试^[6]。刘海瑞等研究了香蕉抗枯萎病突变体,以香蕉枯萎病菌产生的致病毒素为选择压力,在短期内离体诱变和筛选抗香蕉枯萎病的突变体,

收稿日期:201-03-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31140064);河北农业大学青年科学基金(编号:QN201333)。

作者简介:苏媛(1988—),女,河北张家口人,硕士研究生,主要从事植物生态病理学研究。E-mail:15933521328@163.com。

通信作者:甄文超,教授,博士生导师,主要从事植物生态病理学研究。E-mail:wenchao@hebau.edu.cn。

以有效控制,下一步可以上罐分批发酵,进一步优化验证影响多抗菌素发酵的条件。

参考文献:

- [1] 胡永红,曹 峥,杨文革,等. 多效霉素研究进展[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):1-4.
- [2] 吴家全,李军民. 多抗霉素研究现状与市场前景[J]. 农药科学与管理,2010,31(11):21-23.
- [3] Sun L, Chen W Q, Deng Z X, et al. Microbiological assay for quantitative determination of polyoxin B[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(3):361-364.
- [4] 李忠福,陈亚敏. 多氧霉素发酵条件的研究[J]. 中小企业管理

与科技,2009(10):223.

- [5] 于福利,宋喜峰,姜军侠,等. 多抗霉素 B 的高效液相色谱分析方法[J]. 农药,2008(3):188-189.
- [6] 夏湛恩,俞晓平,吕仲贤,等. 新多抗菌素及制备方法和所产生的农作物病害防治药物:中国,200410032099[P]. 2005-01-12.
- [7] 王宏平. 植物保护与持续农业[J]. 湖北植保,2000(2):37-38.
- [8] 吴军林. 防治植物病害的农用抗生素研究及应用[J]. 新农药,2003(4):27-31.
- [9] 李 超,吴雪晴,郑 艳. 乳糖酸产生菌的发酵培养基优化[J]. 食品工业科技,2014,35(3):187-191,356.
- [10] 杨其义,赵祥颖,刘建军. 响应面法优化木糖醇发酵培养基[J]. 齐鲁工业大学学报,2013,27(2):34-38.

提出简便可行的筛选和鉴定方案^[7]。黄丽丽等利用紫外线诱变的方法选育出小麦条锈菌病突变体,该突变体抗病性强、抗性稳定^[8]。赵明敏等以茄子黄萎病菌毒素作为选择剂,离体筛选茄子抗黄萎病突变体,并对不同抗性的茄子幼苗、愈伤组织进行系统研究,结果表明茄子愈伤组织能够较好地表达植株水平的抗性^[9]。本研究以草莓的茎尖生长点为试材,采用病原菌毒素作为选择压力进行诱变处理,离体筛选草莓抗枯萎病突变体,比较突变体与野生型植株的基因型,确保植株水平与分子水平的一致性,旨在为草莓抗病突变体离体筛选程序的确定,及愈伤组织早期抗性鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试草莓品种为丰香、童子一号、全明星、森格那、达赛莱克特。供试病原菌为尖孢镰刀菌草莓专化型,由河北农业大学植病生态学研究室分离得到。

1.2 试验方法

1.2.1 枯萎病菌毒素的制备和毒性测定 将尖孢镰刀菌在 PDA 平板扩繁,从菌落边缘切取直径为 5 mm 的菌丝片,转接至装有 150 mL Czpek's 培养液的三角瓶中,每瓶 5 片,于 25 ℃、110 r/min 条件下,12 h 交替振荡培养 14 d;培养完成后经 4 层纱布过滤,以 5 000 r/min 离心 20 min,取上清液并用 0.45 μm 孔径的微孔滤膜加压过滤,得到的无菌滤液即为毒素原液^[10]。将毒素以 10 倍浓度梯度稀释后浇灌长势基本相同的草莓植株,每株浇灌 15 mL,于 25 ℃、光周期 14 h 光/10 h 暗条件下培养 20 d,观察其根部症状。

1.2.2 草莓抗枯萎病不定芽的筛选 将草莓茎尖(0.1 ~ 0.3 mm)分别接种于含毒素原液 5%、10%、15%、20% 的培养基上,培养 20 d 后统计外植体存活率,确定毒素的半致死剂量,以不含毒素的培养基为对照。每个处理 4 次重复,每个重复 20 个茎尖。采用多步选择法逐级加压筛选:将草莓外植体在含有半致死剂量毒素的培养基上继代培养 3 次后,挑选生长较好的愈伤组织,将其转入毒素浓度高 1 个梯度的培养基上继代培养 3 次,每个继代周期为 30 d,培养完成后调查外植体生长状况。将筛选出的抗性不定芽和野生型不定芽于照度 3 000 lx、光周期 14 h 光/10 h 暗、温度 20 ~ 28 ℃ 条件下生根培养 30 d,之后添加 10% 无菌毒素并继续培养 30 d,测定株高、根长、新生叶片数、干物质质量。以接种于无毒素培养基的植株为对照。

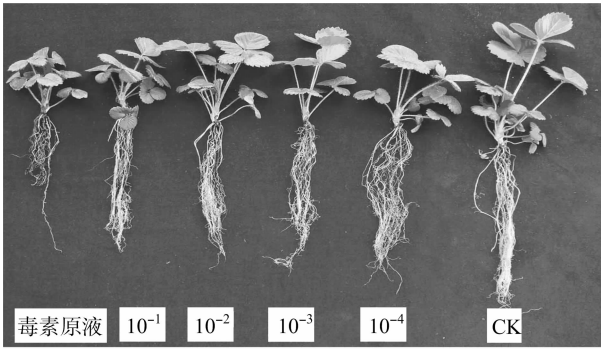
1.2.3 RAPD 检测 草莓叶片基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法,向常规 CTAB 基本提取液中添加 1% PVP、1% 维生素 C、10 mmol/L Na₂S₂O₅、2% β-巯基乙醇^[11]。

草莓 RAPD-PCR 反应体系为:10 mmol/L Tris-HCl(pH 值 9.0)、50 mmol/L KCl、0.1 mmol/L dNTPs、2.1 mmol/L MgCl₂、15 ng 引物、20 ng 模板、IU TaqDNA 聚合酶。反应体积为 25 μL。反应程序为:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 45 s,37 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,42 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。将扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳中电泳,经 EB 染色后在紫外灯下观察^[12]。

2 结果与分析

2.1 枯萎病菌毒素毒力的测定

经毒素处理的草莓植株可产生与枯萎病相似的症状,表明毒素对草莓植株有较强的致病作用,可作为筛选抗枯萎病突变体的选择剂^[13-14]。毒素对草莓植株的毒害作用随着其浓度的增加而增强。经毒素处理的草莓幼苗根部褐变,叶片边缘枯萎,株高、根长、叶片数均低于对照,植株长势衰弱(图 1)。



10^{-x} 表示将毒素原液稀释 10^x 倍
图1 枯萎病菌毒素毒力的测定结果

2.2 毒素选择压力的确定

由表 1 可知,不同剂量毒素对所有品种草莓茎尖的生长均有抑制作用,但品种间差异较大。全明星品种对毒素浓度的变化最为敏感,在 10% 毒素浓度选择压力下,其外植体存活率仅为 6.2%,相当于对照处理的 6.9%;其次为丰香品种,其外植体存活率在 10% 毒素浓度选择压力下仅为 39.8%,相当于对照处理的 44.2%;当毒素浓度升至 15% 时,二者均未检测到存活的外植体。森格纳品种对毒素选择压力的抗性最高,当毒素浓度选择压力为 15% 时,其存活率高达 45.1%,显著高于相同浓度下的其他品种。当毒素浓度进一步提升至 20% 时,森格纳品种的存活率仍达到 6.2%,而其他品种的外植体则全部褐变死亡。可见,15% 毒素含量可作为森格纳品种草莓抗性突变体的筛选压力,其余 4 个品种的选择压力则为 10% 毒素含量。

表 1 不同浓度毒素对外植体存活率的影响

毒素浓度 (%)	存活率 (%)				
	丰香	全明星	童子一号	达赛莱克	森格纳
CK	90.1 ± 4.3b	90.3 ± 3.6b	99.6 ± 3.8a	100.0 ± 0.0a	100.0 ± 0.0a
5	84.9 ± 2.1b	55.1 ± 2.3c	85.2 ± 2.4b	99.8 ± 1.1a	95.2 ± 3.3a
10	39.8 ± 1.5c	6.2 ± 0.5d	49.7 ± 3.6b	54.6 ± 2.0b	65.1 ± 1.3a
15	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	19.8 ± 1.1c	35.1 ± 1.4b	45.1 ± 2.4a
20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.2 ± 1.5

注:同行数据后不同小写字母表示差异显著(P < 0.05)。

2.3 抗性不定芽存活率稳定性测定

5 个品种的草莓在含毒素培养基上继代培养 3 代后,外植体存活率均有所提高(表 2)。在毒素含量为 10% 的培养基上继代培养 3 次后,丰香品种存活率上升幅度最大,显著提高 59.6 百分点;童子一号、达赛莱克特品种次之,存活率分别提高 22.5、20.1 百分点;全明星品种无显著变化。在毒素含量为 15% 的培养基上继代培养 3 次后,森格纳、全明星品种存活率上升幅度最大,显著提高 30.0、29.3 百分点;丰香、童子一号品种次之,分别提高 20.5、17.8 百分点;达赛莱克特品

种存活率提高幅度最小。对比不同毒素浓度下的继代培养结果可知,15% 毒素浓度下继代 3 次培养的草莓抗性不定芽,其存活率均不同程度低于 10% 毒素浓度。其中,下降幅度最小的全明星品种仅为 7.6 百分点,而下降幅度最大的达赛莱克特品种达到 42.4 百分点。可见,逐步提高毒素浓度将使外植体的存活率下降,不同品种草莓对毒素的抗性不同。经粗毒素连续筛选得到的抗性不定芽,对枯萎病菌毒素具有较为稳定的抗性。

表 2 不同浓度毒素对抗性不定芽存活率稳定性的影响

毒素浓度 (%)	继代次数	存活率 (%)				
		丰香	全明星	童子一号	达赛莱克特	森格纳
10	1	40.2 ± 2.5c	55.1 ± 2.8a	50.2 ± 3.6b	54.8 ± 3.4a	0.00 ± 0.00c
	2	50.1 ± 4.1b	55.5 ± 2.4a	60.1 ± 4.1ab	63.4 ± 2.9a	0.00 ± 0.00c
	3	99.8 ± 6.2a	57.1 ± 2.2a	72.7 ± 2.5c	74.9 ± 2.5b	0.00 ± 0.00c
15	1	50.1 ± 1.8b	20.2 ± 3.1b	37.5 ± 2.5b	22.3 ± 3.6b	44.8 ± 5.0b
	2	55.2 ± 2.1b	22.5 ± 2.5b	42.5 ± 4.2b	25.4 ± 4.1b	49.6 ± 1.4b
	3	70.6 ± 2.4a	49.5 ± 4.1a	55.3 ± 3.4a	32.5 ± 3.4a	74.8 ± 2.5a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

2.4 抗性不定芽抗毒素分化稳定性测定

对筛选到的 5 个毒素抗性较强的不定芽进行命名。将全明星品种经筛选得到的 2 个不定芽分别命名为 AS-1、AS-2;将童子一号品种经筛选得到的不定芽命名为 TZ-1;将达赛莱克特品种经筛选得到的不定芽命名为 DA-1;将森格纳品种经筛选得到的不定芽命名为 SE-1。对上述 5 个不定芽进行

抗毒素分化能力测定,结果(表 3)表明,在相同继代次数对照培养基培养下,5 个抗性不定芽与相应品种野生型不定芽的分化程度无显著差异。在含有毒素的培养基上培养,AS-1、TZ-1 抗性不定芽分化最为稳定,分别高于同品种野生型不定芽 49.61%、50.38%;其他 3 个抗性不定芽的稳定性与同品种野生型不定芽相比显著提高,平均提高 28.54%。

表 3 毒素对抗性不定芽分化稳定性的影响

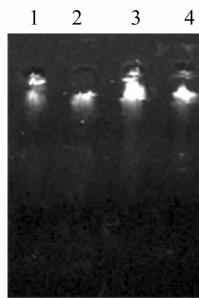
编号	毒素浓度 (%)	继代次数	对照		处理	
			抗性不定芽(个)	野生型不定芽(个)	抗性不定芽(个)	野生型不定芽(个)
AS-1	10	1	9.34 ± 0.25a	10.01 ± 0.99a	5.58 ± 0.42a	3.68 ± 0.19b
		2	10.28 ± 0.31a	10.62 ± 1.03a	5.27 ± 0.39a	3.91 ± 0.11b
		3	9.15 ± 0.24a	9.92 ± 1.05a	6.52 ± 0.51a	4.02 ± 0.16b
AS-2	10	1	9.79 ± 0.52a	10.90 ± 0.94a	5.10 ± 0.29a	3.93 ± 0.21b
		2	10.04 ± 0.33a	10.53 ± 1.12a	5.18 ± 0.41a	3.84 ± 0.17b
		3	11.11 ± 0.85a	9.78 ± 0.91a	4.74 ± 0.31a	3.79 ± 0.12b
TZ-1	10	1	9.98 ± 0.82a	9.60 ± 0.99a	5.12 ± 0.29a	4.00 ± 0.15b
		2	10.32 ± 0.78a	11.02 ± 1.12a	6.39 ± 0.51a	3.70 ± 0.12b
		3	10.75 ± 0.92	9.97 ± 1.02a	6.14 ± 0.33a	4.03 ± 0.16b
DA-1	10	1	10.10 ± 1.05a	10.21 ± 1.13a	4.90 ± 0.36a	4.12 ± 0.11b
		2	11.02 ± 1.05a	9.71 ± 0.92a	5.34 ± 0.28a	3.99 ± 0.13b
		3	10.63 ± 0.97a	10.29 ± 1.06a	4.80 ± 0.32a	3.61 ± 0.14b
SE-1	15	1	9.90 ± 1.02a	11.57 ± 1.11a	5.20 ± 0.33a	3.80 ± 0.18b
		2	10.78 ± 0.89a	9.72 ± 0.82a	4.34 ± 0.41a	3.77 ± 0.09b
		3	9.35 ± 0.95a	10.12 ± 0.97a	4.71 ± 0.23a	3.63 ± 0.16b

2.5 草莓抗枯萎病突变体的 RAPD 分析

选取毒素抗性较好的不定芽进行分子鉴定,提取 AS-1、TZ-1、全明星、童子一号品种草莓基因组 DNA(图 2),所提取的 DNA 呈无色透明状,易溶于 TE 溶液。草莓基因组 DNA 在 0.7% 琼脂糖凝胶上的电泳结果表明,DNA 提取量较多,DNA 完整无降解,可直接用于试验。选用引物 OPP-18 对全明星、AS-1、童子一号、TZ-1 品种草莓基因组 DNA 进行多态性分析(图 3),样品在 1.4% 琼脂糖凝胶上的电泳结果表明,全明星、AS-1 品种的条带存在差异,在 750~1 000 bp 存

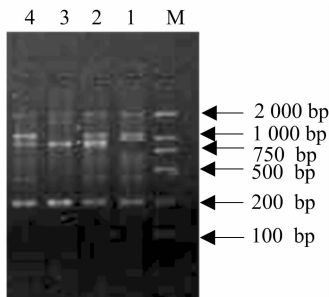
在特异性条带。几次试验的重复性较高,可扩增得到稳定的特异性条带,因此可利用引物 OPP-18 区分全明星、AS-1 品种。使用引物 OPO-05 筛选时并未扩增出特异性条带,但全明星、AS-1 品种的条带亮度不同(图 4)。选用引物 OPP-18 对 TZ-1、童子一号品种草莓 DNA 进行多态性分析,在 1.2% 琼脂糖凝胶上的电泳结果表明,TZ-1、童子一号品种的条带存在差异,在 750~1 000 bp 存在特异性条带。几次试验的重复性较高,可扩增得到稳定的特异性条带。使用引物 OPO-05 筛选时并未扩增出特异性条带,而扩增出 3 条清

晰可辨的非特异性条带。结果表明,所获得的抗性植株与野生型植株在 DNA 水平(即碱基)发生了改变,可被认为是突变体。而这些多态性位点是否与抗枯萎病有关仍需进一步鉴定。



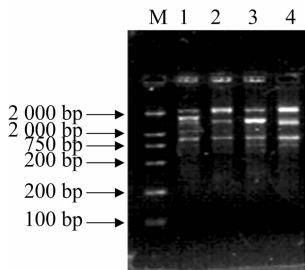
1、2、3、4 分别为 AS-1、全明星、TZ-1、童子一号品种

图2 基因组 DNA 电泳检测结果



1、2、3、4 分别为 AS-1、全明星、TZ-1、童子一号品种; M 为 marker DL-2000

图3 引物 OPP-18 扩增产物



1、2、3、4 分别为 AS-1、全明星、TZ-1、童子一号品种; M 为 marker DL-2000

图4 引物 OPO-05 扩增产物

3 结论与讨论

以毒素作为选择压力筛选草莓抗枯萎病突变体时,毒素选择压力小不易于筛选出高抗材料;选择压力大则导致芽存活率低,不利于筛选工作的进行。多数研究者认为,筛选时采用半致死水平的浓度较为合理^[15]。本研究采用草莓枯萎病菌粗毒素处理草莓植株,发现其对植株具有较强的毒害作用,使植株产生与枯萎病相似的症状^[16]。进一步筛选毒素选择压力时发现,采用 15% 毒素含量(半致死剂量)作为森格纳品种的筛选压力,并采用 10% 毒素含量作为丰香、童子一号、全明星、达赛莱克特品种的筛选压力,筛选抗性不定芽时取得了较好的诱导效果,这与前人的研究结论相一致。

目前,大多采用正选择法从作物中获得抗病突变体^[17],即确定筛选压力后逐步递增毒素浓度,逐步提高外植体的抗性^[18]。此方法获得的材料抗性稳定,避免突变体因无法适应毒素浓度的突然增大而死亡。本研究采用正选择法得出结

论,在 15% 毒素浓度下继代 3 次培养的草莓抗性不定芽,其存活率均不同程度低于 10% 毒素浓度。其中,下降幅度最小的全明星品种仅为 7.6%。对筛选得到的突变体进行室内接种试验,测定毒素抗性较强的不定芽的分化稳定性。在含毒素的培养基上培养,AS-1、TZ-1 抗性不定芽分化最为稳定,分别高于同品种野生型不定芽 49.61%、50.38%;因此,在含毒素的培养基上继代培养可提高不定芽对毒素的抗性。通过 RAPD 分析可知,TZ-1、童子一号品种的条带存在差异,在 750~1 000 bp 存在特异性条带(1.2% 琼脂糖凝胶电泳);采用引物 OPO-05 对其进行筛选,扩增出 3 条清晰可辨的非特异性条带,表明所获得的抗性植株与野生型植株在 DNA 水平上发生了改变。RAPD 检测到的非特异性条带是否与枯萎病抗性有关,以及抗性不定芽在田间的抗病表现仍须进一步研究。

参考文献:

- [1] 扈金丽,尹宝重,甄文超,等. 防治草莓连作障碍的复合生防制剂的筛选[J]. 中国农学通报,2011,27(13):249-252.
- [2] Cao K Q, Wang S T. Autotoxicity and soil sickness of strawberry (*Fragaria × ananassa*) [J]. Allelopathy Journal, 2007, 20(1): 113-130.
- [3] 高亚娟. 草莓连作障碍土壤改良技术研究[D]. 扬州:扬州大学,2013.
- [4] 韩 珊,朱天辉,李芳莲,等. 植物病原真菌毒素作用机理研究进展[J]. 四川林业科技,2008,29(6):26-30.
- [5] 马春红,翟彩霞,王立安,等. 玉米小斑病菌 T 小种培养滤液对玉米抗病性的诱导[J]. 中国农业科学,2005,38(8):1578-1584.
- [6] 刘进平,郑成木. 体外选择与体细胞无性系变异在抗病育种中的应用[J]. 遗传,2002,24(5):617-630.
- [7] 刘海瑞,许文耀,林成辉. 利用枯萎病菌粗毒素筛选香蕉抗性突变体[J]. 亚热带农业研究,2007,3(3):231-234.
- [8] 黄丽丽,王欣丽,康振生,等. 紫外线诱导小麦条锈菌毒性突变及突变体的 RAPD 分析[J]. 菌物学报,2005,24(3):400-406.
- [9] 赵明敏,刘正坪,霍秀文,等. 利用病原真菌毒素离体筛选茄子抗黄萎病突变体的研究[J]. 华北农学报,2006,21(1):92-95.
- [10] 黄永辉,李瑜婷,范家平,等. 香蕉枯萎病菌 4 号生理小种产生毒素条件的优化[J]. 华中农业大学学报,2011,30(5):594-598.
- [11] 束 靖. RAPD 在草莓、玫瑰遗传多样性检测和种质鉴定中的应用[D]. 泰安:山东农业大学,2003.
- [12] 李永灿. 利用病原真菌毒素离体筛选番茄抗灰霉病突变体[D]. 南京:南京农业大学,2012.
- [13] 李 妮,燕丽萍,刘翠兰,等. 红叶石楠 RAPD 反应体系的优化[J]. 中国农学通报,2012,28(34):53-57.
- [14] 兀旭辉,许文耀,林成辉,等. 香蕉枯萎病菌粗毒素特性的初步研究[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2004 年学术年会论文集. 北京:中国农业科学技术出版社,2004.
- [15] 赵 杰,王 静,李乃会,等. 烟草镰刀菌根腐病菌致病粗毒素的研究[J]. 植物保护,2013,39(3):61-66.
- [16] 杨 媚,黄永辉,舒灿伟,等. 香蕉枯萎病菌 4 号生理小种粗毒素特性的研究[J]. 园艺学报,2012,39(3):545-551.
- [17] 刘 慧,杨 军,王立强,等. 苦马豆抗盐愈伤组织突变体的筛选[J]. 中国农学通报,2009,25(20):58-62.
- [18] Matsumoto K, Souza L A, Barbosa M L. In vitro selection for fusarium wilt resistance in banana. I. Co-cultivation technique to produce culture filtrate of race 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Fruits, 1999, 54(2):97-102.