

## 康乃馨抗尖孢镰刀菌无性系诱变技术

王丽花, 蒋亚莲, 许 凤, 杨秀梅, 黄望启, 苏 艳, 张丽芳, 张艺萍

(云南省农业科学院 花卉研究所/国家观赏园艺工程技术研究中心/云南省花卉育种重点实验室/

云南省花卉技术创新中心/昆明市花卉遗传改良重点实验室, 云南 昆明, 650205)

**摘要:** 枯萎病是康乃馨鲜切花种植过程中较为严重的真菌病害之一, 该病的病原菌是尖孢镰刀菌康乃馨专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*), 培育和合理种植抗病品种是防控康乃馨枯萎病最有效的方法之一。应用植物体细胞无性系变异及真菌毒素加压筛选技术, 可以定向培育康乃馨抗病育种材料并加快抗病品种选育速度, 为康乃馨抗病育种提供新的思路。为获得抗枯萎病的康乃馨育种中间材料, 以感枯萎病的康乃馨多花品种紫蝴蝶组培苗为试验材料, 诱导愈伤组织并进行悬浮培养建立悬浮培养系, 再用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变后添加尖孢镰刀菌毒素粗提液筛选抗病细胞系。结果表明, 诱导愈伤组织最适宜的培养基是 Murashig-Skoog 培养基+麦草畏 1.0 mg/L; 筛选出 EMS 最佳处理组合为 0.4% 处理 4 h; 在 80.0% 的粗毒素培养基上培养 10 d 是康乃馨抗尖孢镰刀菌无性系筛选较适宜的选择压; 诱导康乃馨再生植株较好的激素组合是 6-氨基腺嘌呤(BA) 0.5 mg/L+噻苯隆(TDZ) 0.1 mg/L+萘乙酸(NAA) 0.1 mg/L; 经人工接种尖孢镰刀菌进行抗病性鉴定后发现, 紫蝴蝶抗病无性系的病情指数为 45, 为中抗水平。

**关键词:** 康乃馨; 尖孢镰刀菌; 诱变; 毒素; 无性系

中图分类号: S436.8<sup>+</sup>1

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2024)03-0094-08

## Clonal Mutagenesis Technique of Carnation Resistance to *Fusarium oxysporum*

WANG Lihua, JIANG Yalian, XU Feng, YANG Xiumei, HUANG Wangqi,

SU Yan, ZHANG Lifang, ZHANG Yiping

(Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences/National Ornamental Horticulture

Engineering Research Center/Yunnan Flower Breeding Key Laboratory/Yunnan Flower Technology

Innovation Center/Kunming Flower Genetic Improvement Key Laboratory, Kunming 650205, China)

**Abstract:** Carnation wilt disease is one of the most serious fungal diseases in the planting process of fresh cut flowers of carnations. It has been reported that this disease is caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Breeding and rational utilization of resistant varieties is still one of the most effective methods to control carnation *Fusarium* wilt. Using somaclonal variation and *in vitro* screening of toxins can cultivate disease-resistant breeding materials of carnations, accelerate the breeding process of disease resistant varieties, and provide new ideas for disease resistant breeding for carnations. To obtain breeding intermediate materials with resistance to wilt disease of carnations, in this study, tissue cultures derived from *in vitro* plantlets of spray carnation Purple Butterfly, which is susceptible to *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, were successfully used for induction of callus tissue and establishment of a suspension culture system through suspension culture. Resistant cell lines were screened by adding crude extract of *F. oxysporum* toxin after mutagenesis with ethyl methanesulfonate(EMS). The results showed that the optimal culture medium for inducing callus tissue was Murashig-Skoog medium+ 1.0 mg/L of dicamba, the screened optimal EMS combination was 0.4% and 4.0 hours of treatment. The appropriate selection pressure for screening carnation clones resistant to *F. oxysporum* was cultivation on 80.0% of crude toxin medium for 10 days. The optimal combination of hormones for induction of regenerated plants of carnations was 0.5 mg/L of 6-benzylaminopurine(BA) + 0.1 mg/L of thidiazuron(TDZ) + 0.1 mg/L of 1-naphthaleneacetic acid(NAA). Disease resistance identification by artificial inoculation with *F. oxysporum* found that the disease index of the disease resistant clone of Purple Butterfly was 45, indicating it was at medium-resistance level.

**Key words:** carnation; *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*; mutation; toxin; clones

收稿日期: 2023-06-21

基金项目: 云南省种子种业联合实验室项目(202205AR070001); 云南省财政厅绿色食品种牌打造科技支撑行动(花卉)专项(53000021000000013742)

作者简介: 王丽花(1977-), 女, 云南祥云人, 研究员, 主要从事花卉质量检测研究工作。

通信作者: 张艺萍(1977-), 女, 云南剑川人, 研究员, 博士, 主要从事花卉抗病育种与病虫害综合防控研究工作。

康乃馨 (*Dianthus caryophyllus* L.) 为石竹科 (Caryophyllaceae) 石竹属 (*Dianthus* Linn) 多年生草本植物, 与月季、菊花并列为全球三大切花<sup>[1]</sup>, 在全球鲜切花销售额中占 15.0% 左右。制约康乃馨鲜切花生产质量品质提高的首要因素就是病虫害问题。由尖孢镰刀菌康乃馨专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*) 引起的枯萎病是康乃馨生产中最严重的病害之一<sup>[2]</sup>, 全世界康乃馨生产区均有感染和为害的报道。该病在我国各康乃馨生产区普遍发生, 危害较重, 防治困难, 造成了严重的经济损失。为有效防控康乃馨枯萎病, 对该病害的病原生物学、防控技术、抗性机理等方面都有研究<sup>[3-9]</sup>, 基本明确了康乃馨枯萎病菌的生长习性、发生流行规律及部分抗性机理。针对尖孢镰刀菌的防控也有尝试生物防治和植物源农药的开发, 如针对红芸豆根腐病菌尖孢镰刀菌筛选出了有较好防控效果的拮抗内生细菌<sup>[10]</sup>。马红军等<sup>[11]</sup>研究发现, 丁香、甘草 2 种醇提取物对抑制尖孢镰刀菌有较好的效果, 但就康乃馨枯萎病来说, 培育和合理种植抗病品种仍然是比较有效的防控方法之一。胡忠亮等<sup>[12]</sup>将 *GAFP-NPI* 双价抗病基因导入康乃馨 Tuareg、Ciao Bianco、Asso 品种中, 并利用康乃馨镰刀菌粗毒素进行抗病性鉴定, 获得 8 个抗病品系。应用植物体细胞无性系变异及真菌粗毒素加压筛选技术可以定向培育抗病育种材料。1981 年 LARKIN 等<sup>[13]</sup>把细胞培养获得的再生植株称为体细胞无性系 (Somaclones), 并在检索分析前人的研究结果基础上提出了体细胞无性系变异 (Somaclonal variation)。因在自然无性繁殖过程中发生的变异概率很低, 所以, 很多科学研究工作者采用化学诱变以获得变异

系, 随后根据育种目标如抗病、抗热、耐冷等, 对突变体进行培育和选择, 最终获得育种中间材料。甲基磺酸乙酯 (EMS) 是目前最常用的化学诱变剂。最早在 1977 年 CARLSON<sup>[14]</sup> 用 EMS 处理烟草原生质体, 以烟草野火病毒毒素类似物 MSO 为定向选择剂, 筛选出了抗病突变体。利用病原菌毒素作为加压筛选剂, 已筛选出抗唐菖蒲根腐病<sup>[15]</sup>、抗丽格海棠茎腐病<sup>[16]</sup>、抗百合枯萎病<sup>[17]</sup>、抗茄子黄萎病<sup>[18]</sup>、抗番茄晚疫病<sup>[19]</sup>和抗香蕉枯萎病<sup>[20]</sup>等突变体, 但在康乃馨上还没有做过相关的尝试。

本试验以康乃馨多花品种紫蝴蝶作为试验材料, 诱导愈伤组织, 采用 EMS 诱变并附加尖孢镰刀菌毒素筛选, 以获得抗尖孢镰刀菌的育种中间材料, 旨在为培育康乃馨抗病品种提供技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验于 2022 年在云南省花卉育种重点实验室进行。

试验材料为感病的康乃馨多花品种紫蝴蝶组培苗, 由云南省农业科学院花卉研究所花卉育种重点实验室收集保存并繁殖。

所用尖孢镰刀菌康乃馨专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*) 菌株为从康乃馨枯萎病株上分离培养获得, 并用王继华等<sup>[21]</sup>的方法经分子指纹鉴定和形态学鉴定, 于马铃薯蔗糖培养基 (PSA) 上并置于 25.0 °C 培养箱中保存备用。

所用的培养基为 MS 基础培养基, 为实验室自行配制, 所用的激素如表 1 所示。

表 1 试验所用激素  
Tab.1 Hormones used in the test

激素	Plant hormone	缩写	Abbreviation	厂家	Manufacturer	纯度/%	Purity
6-苄氨基嘌呤	6-Benzylaminopurine	BA	BA	南京化学试剂股份有限公司		99	
激动素	Kinetin	KT	KT	南京化学试剂股份有限公司		98	
噻苯隆	Thidiazuron	TDZ	TDZ	南京化学试剂股份有限公司		98	
吲哚丁酸	3-Indolebutyric acid	IBA	IBA	南京化学试剂股份有限公司		98	
萘乙酸	1-Naphthaleneacetic acid	NAA	NAA	南京化学试剂股份有限公司		99	

### 1.2 试验方法

1.2.1 康乃馨愈伤组织的诱导培养 采用康乃馨组培苗的茎段、叶片、茎尖分别诱导培养愈伤组织, 培养基添加 30.0 g/L 蔗糖, pH 值 5.8, 水解酪蛋

白 300.0 mg/L, 设置 5 个麦草畏质量浓度 (0.1、0.3、0.5、1.0、2.0 mg/L)。

1.2.2 愈伤组织悬浮培养及 EMS 诱变 取鲜质量 2.0 g 疏松易碎的愈伤组织接种至 100.0 mL 锥形瓶

中,瓶内为 40.0 mL 不含琼脂的诱导愈伤组织的最适宜液体培养基。在 25 °C, 120 r/min 恒温摇床中振荡培养。每 7 d 称量一次,最终统计愈伤组织悬浮培养的生长速率。在整个康乃馨愈伤组织悬浮培养过程中每 28 d 继代一次,继代时参照权永辉<sup>[22]</sup>的方法进行。参考 ZHANG 等<sup>[23]</sup>的方法进行 EMS 诱变,主要是配制体积分数分别为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 的 EMS 溶液,对照为无菌水,将康乃馨细胞团浸泡于上述不同体积分数的 EMS 溶液中分别处理 1、2、4、6 h,再用无菌水漂洗 3~4 遍后转接到愈伤组织继代培养基中培养,20 d 后统计存活率并查看其生长状态。

1.2.3 尖孢镰刀菌粗毒素的制备 参照台莲梅等<sup>[24]</sup>的制备方法进行。

1.2.4 尖孢镰刀菌毒素筛选压的确定 分别配制体积分数 20%、40%、60%、80% 的毒素粗提液加入愈伤组织继代液体培养基中(经前期试验确定为 Murashig-Skoog 培养基+麦草畏 1.0 mg/L+水解酪蛋白 300.0 mg/L)。对照(CK)为不加毒素粗提液的愈伤继代液体培养基。将康乃馨多花品种紫蝴蝶的愈伤组织分别接种到上述不同浓度毒素粗提液培养基中,在培养室培养 10 d 后观察、统计愈伤组织的存活率。以存活率为 10.0%~30.0% 的粗毒素浓度为临界致死浓度<sup>[25]</sup>。

1.2.5 尖孢镰刀菌毒素加压筛选 参考丁丁等<sup>[17]</sup>的技术,应用一步选择法进行加压筛选,将康乃馨多花品种紫蝴蝶经 EMS 诱变的细胞团接种于添加毒素粗提液的选择培养基上,15 d 后将存活的细胞团转入未加粗毒素的培养基上培养 15 d,而后再转入含有粗毒素选择培养基进行筛选培养,如此反复筛选 3~5 次。将最终存活下来的细胞团转入再生培养基中诱导分化再生植株,30 d 后统计分化再生率。不同的再生培养基配方如表 2 所示。

表 2 再生培养基配方  
Tab.2 Formulas of regeneration medium mg/L

编号 Number	BA	KT	TDZ	IBA	NAA
R1	1.0	0.1	0.0	0.1	0.0
R2	1.0	0.0	0.1	0.0	0.1
R3	0.5	0.1	0.0	0.1	0.0
R4	0.5	0.0	0.1	0.0	0.1

1.2.6 抗尖孢镰刀菌无性系再生苗的抗病性鉴定 对康乃馨多花品种紫蝴蝶的组培小苗和筛选出

来的抗病再生苗人工接种康乃馨尖孢镰刀菌进行抗病性鉴定,配制孢子悬浮液(孢子  $1.0 \times 10^6$  个/mL)并添加吐温以增加孢子附着力,每株小苗灌根 3.0 mL,灌根后保湿以创造有利于发病的条件,每处理 10 株,重复 3 次,每重复 10 株<sup>[17,26]</sup>。20 d 后观察筛选株的感病情况。病情分级标准<sup>[27]</sup>为:0 级,无病症;1 级,基部叶片轻微发黄;2 级,基部叶片发黄,干枯;3 级,一侧枝条弯曲或枯死;4 级,所有枝条表现病症;5 级,死亡。根据统计情况计算病情指数。

$$DI = \frac{\sum(s \times n)}{N \times S} \times 100 \quad (1)$$

式中,DI 为病情指数;s 为各病情级别代表数值;n 为各病情级别植株数;N 为调查总植株数;S 为最高病情级别的代表数值。

计算出平均病情指数后将抗病程度分为 6 类,康乃馨枯萎病抗性评价标准如表 3 所示。

表 3 康乃馨枯萎病抗性评价标准  
Tab.3 Criterion of resistance evaluation of carnation wilt

平均病情指数(DI) Mean disease index	抗性评价 Resistance evaluation
DI=0.0	免疫(I)
0.0<DI<12.5	高抗(HR)
12.5≤DI<25.0	抗病(R)
25.0≤DI<50.0	中抗(MR)
50.0≤DI<75.0	感病(S)
75.0≤DI≤100.0	高感(HS)

### 1.3 数据分析

应用 Microsoft Excel 2000 和 SPSS 13.0 软件处理分析数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 康乃馨愈伤组织诱导结果

为诱导出生长较好的康乃馨愈伤组织,比较了康乃馨不同部位和不同浓度麦草畏的诱导效果,配制了不同浓度的麦草畏对康乃馨组培苗的茎段、叶片和茎尖进行培养,结果表明(表 4),茎段、叶片、茎尖在麦草畏 1.0 mg/L 时诱导率最高,并且与麦草畏其他浓度差异性显著( $P < 0.05$ ),愈伤组织诱导率均为 85.0% 以上,且叶片的最高为 94.4%,诱导出的愈伤组织生长状态较好,都是黄色疏松的愈伤组织(图 1)。

表4 不同质量浓度麦草畏对紫蝴蝶组培苗不同部位愈伤组织诱导的影响  
Tab.4 Effects of different concentrations of dicamba on induction of different parts of Purple Butterfly callus %

麦草畏质量浓度/(mg/L) Dicamba mass concentration	茎段愈伤诱导率 Callus inductivity rate of stem	叶片愈伤诱导率 Callus inductivity rate of leaf	茎尖愈伤诱导率 Callus inductivity rate of shoot-tip
0.1	55.6±2.9c	33.3±1.9d	71.1±4.8b
0.3	28.9±2.9d	60.0±3.9b	45.6±4.0c
0.5	53.3±3.8c	44.4±4.0c	66.7±3.9b
1.0	86.7±1.9a	94.4±1.1a	85.6±2.9a
2.0	72.2±4.0b	63.3±3.9b	43.3±1.9c

注:同一列不同小写字母表示使用Duncan多重比较在0.05水平差异显著。下表同。

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant differences at 0.05 level by Duncan's multiple range test. The same as below.



图1 康乃馨组培苗不同部位愈伤组织的诱导  
A. 叶片培养10 d后诱导出的愈伤组织; B. 茎尖培养20 d后诱导出的愈伤组织; C. 茎段培养20 d后诱导出的愈伤组织  
A. The callus formed from leaf after cultured for 15 d; B. The callus formed from shoot-tip after cultured for 20 d; C. The callus formed from stem after cultured for 20 d

图1 康乃馨组培苗不同部位愈伤组织的诱导  
Fig.1 Callus induction of different parts of carnation tissue cultures

## 2.2 康乃馨愈伤组织悬浮培养体系的建立

不同外植体类型诱导获得的愈伤组织悬浮培养的增殖情况如图2所示。

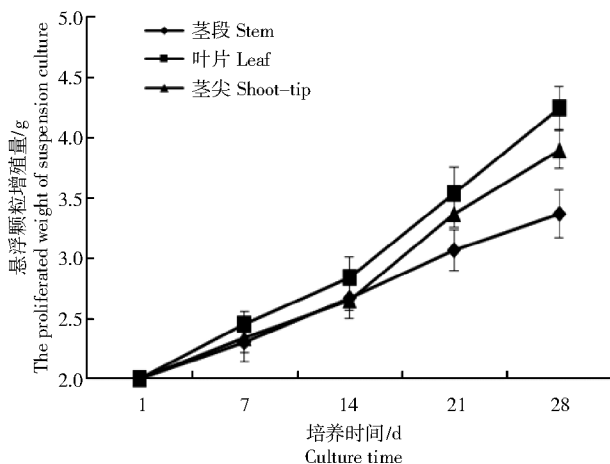


图2 不同外植体类型诱导获得的愈伤组织悬浮培养的增殖情况  
Fig.2 Proliferation of callus induced by different types of explants in suspension culture

将茎段、叶片和茎尖经麦草畏诱导的康乃馨愈伤组织转接至本研究筛选出最适宜的麦草畏质量浓度1.0 mg/L的悬浮培养液中。在培养初期,愈

伤组织悬浮培养物呈黄色、疏松颗粒状,不断培养增殖后建立起悬浮培养系。在整个康乃馨愈伤组织悬浮培养过程中,对各愈伤悬浮颗粒称质量后发现其增殖速率不同,结果如图2所示,悬浮培养颗粒在培养的前7 d都有一个生长迟滞期,而后愈伤组织悬浮颗粒增殖速率逐步上升,在培养的14~28 d达到对数期。此后生长逐步平稳,但需要更换新鲜的培养液。从图2还可以看出,由叶片诱导的愈伤组织悬浮颗粒增速最明显,培养28 d后,鲜质量增加至4.3 g。

## 2.3 康乃馨悬浮细胞团EMS诱变结果

从表5可以看出,在相同甲基磺酸乙酯浓度处理下,随着处理时间的增加,悬浮细胞团存活的比率降低;在同一处理时间下,随着甲基磺酸乙酯浓度增加,悬浮细胞团存活的比率也在降低。用甲基磺酸乙酯处理1 h,其对细胞团的诱变力不强,生理损伤不明显,各甲基磺酸乙酯浓度处理对悬浮细胞团的诱变效果差别不显著,存活率都在60.0%以上。但随着处理时间的延长,存活率表现出下降趋势,当处理时间为6 h时,各处理浓度的悬浮细胞团都变褐且存活率较低。最终根据对悬浮细胞团处

理的 50.0% 致死剂量, 确定悬浮细胞团的甲基磺酸乙酯最佳处理组合为 0.4% 处理 4 h。

表 5 康乃馨细胞团经过 EMS 处理后的存活率  
Tab.5 The survival rate of cells aggregates of carnation after EMS treatment %

EMS 体积分数/% EMS concentration	处理时间/h Processing time			
	1	2	4	6
0.0	92.4±1.0a	91.2±0.9a	85.5±1.2a	84.0±1.0a
0.2	83.7±1.1b	78.6±1.2b	73.3±1.1b	43.5±1.2b
0.4	73.5±1.2c	68.8±1.2c	43.5±1.3c	35.5±1.3c
0.6	70.6±1.1c	63.4±1.0d	37.5±1.0d	32.2±1.2c
0.8	62.4±1.1d	50.5±1.2e	33.3±1.1e	23.6±1.2d

#### 2.4 尖孢镰刀菌毒素筛选压的确定

粗毒素胁迫对康乃馨愈伤组织存活率和相对生长量的影响如表 6 所示。

表 6 粗毒素胁迫对康乃馨愈伤组织存活率和相对生长量的影响  
Tab.6 Effects of crude toxin stress on survival rate and relative growth of carnation callus %

粗毒素体积分数/% Crude toxin volume fraction	存活率 Survival rate	相对生长量 Relative growth
0.0	100.0a	100.0a
20.0	98.7±0.9a	82.9±1.3b
40.0	89.0±1.5b	68.0±1.6c
60.0	47.4±2.3c	32.2±1.7d
80.0	23.7±1.9d	15.6±1.0e

从表 6 可以看出, 不同体积分数的尖孢镰刀菌粗毒素对康乃馨愈伤组织的生长均有抑制作用。随着粗毒素体积分数的上升, 愈伤组织存活率降低, 抑制生长效果愈发明显。康乃馨愈伤组织在含

有 80.0% 毒素粗提液中存活率仅为 23.7%。从康乃馨愈伤组织的生长状态来看, 10 d 时, 80.0% 毒素粗提液处理的康乃馨愈伤组织较松散, 后期褐化死亡, 存活率较低, 因此, 80.0% 毒素粗提液处理 10 d 可以作为大部分康乃馨植株细胞生长的一个拐点, 在康乃馨抗枯萎病菌无性系筛选试验中, 80.0% 粗毒素就是其临界致死浓度, 可用含 80.0% 粗毒素的培养基作为筛选培养基。

#### 2.5 抗尖孢镰刀菌无性系的获得

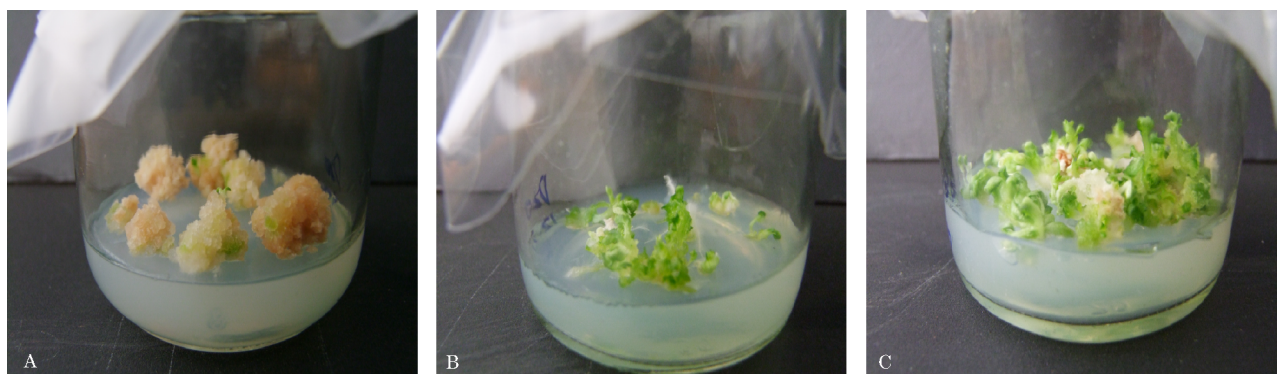
采用一步选择法经尖孢镰刀菌粗毒素筛选后, 120 个康乃馨多花品种紫蝴蝶的悬浮细胞团有 13 个存活下来, 存活率为 10.8%, 其中又有 3 个细胞团分化为再生植株, 分化率为 23.1%, 其最终的突变率仅为 2.5%。上述结果表明, 经粗毒素处理的康乃馨细胞可以发生突变, 康乃馨细胞团能在枯萎病菌毒素的临界致死浓度下存活下来。

为提高抗尖孢镰刀菌无性系的再生能力及繁殖系数, 采用了不同的激素组合培养分化出来的不定芽, 结果发现, 再生植株生长较好的激素组合是 R4 (BA 0.5 mg/L+TDZ 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L), 植株生长正常, 无玻璃化现象, 植株增殖较快(表 7、图 3)。

表 7 不同激素组合对康乃馨细胞团加压筛选后再生率的影响

Tab.7 Effects of different combination of hormone on regeneration rate of carnation cells aggregates after pressure screening

编号 Number	再生率/% Regeneration rate	再生植株生长状态 Growth state of regenerated plants
R1	14.3±2.7d	植株玻璃化较重
R2	34.0±1.7b	植株生长一般
R3	25.9±1.9c	有些再生植株玻璃化
R4	43.5±1.4a	植株生长较好



A. 刚分化出来的小芽; B. 再生植株的形成; C. 大量再生植株的形成

A. Small buds just generated. B. Formation of plant regenerated. C. Formation of mass plant regenerated

图 3 康乃馨细胞团毒素加压筛选后的再生情况

Fig.3 Regeneration situation of carnation cells aggregates after toxin pressure screening

## 2.6 抗尖孢镰刀菌无性系的抗病性

以康乃馨多花品种紫蝴蝶组培小苗为对照,对比其抗尖孢镰刀菌筛选株的抗病性。紫蝴蝶抗枯萎病菌无性系人工接种尖孢镰刀菌孢子悬浮液后20 d,植株生长正常,对尖孢镰刀菌表现出一定的抗病性。紫蝴蝶的病情指数为89.0%,为高感品种,而经尖孢镰刀菌粗毒素加压筛选获得的紫蝴蝶抗病无性系的病情指数为45.0%,为中抗水平。

## 3 结论与讨论

本课题组前期研究中使用2,4-D进行康乃馨愈伤组织的诱导,愈伤组织能生长,但得到的愈伤组织较硬、不疏松,且无法再生形成植株。UJJWAL等<sup>[28]</sup>采用2,4-D和BA组合诱导愈伤组织,诱导率达90.5%,这与程晓岩<sup>[29]</sup>采用2,4-D和BA组合诱导愈伤组织的结果不同。本试验则使用麦草畏对康乃馨多花品种紫蝴蝶组培苗的不同部位诱导愈伤组织,得到了黄色、疏松的愈伤组织,且再生能力较好,是国内研究麦草畏在诱导康乃馨愈伤组织中的首次成功案例。

本研究筛选出康乃馨细胞团EMS最佳的处理组合为0.4%处理4.0 h,这与陆玉建等<sup>[30]</sup>筛选出的EMS诱变绿萝愈伤组织的处理组合0.6% EMS诱变处理4 h或0.8% EMS诱变处理2 h稍有不同,但基本规律是低浓度EMS处理时间长,而高浓度EMS处理时间要短。本研究应用EMS诱变及康乃馨尖孢镰刀菌毒素粗提液离体加压筛选技术,得到了抗康乃馨枯萎病突变材料,说明诱变加压筛选可定向选育抗病性中间材料,这与林丛发等<sup>[31]</sup>利用叶斑病菌粗毒素离体筛选获得了太子参抗叶斑病突变体、苏媛等<sup>[32]</sup>利用枯萎病菌毒素筛选获得草莓枯萎病抗性突变体的研究结果一致。

应用病原菌致病粗毒素筛选抗病材料时采用逐步递增粗毒素浓度的正选择法较多,但也可以先筛选出临界致死浓度,而后再进行一步选择反复多次筛选法进行加压筛选突变体。刘海瑞等<sup>[33]</sup>应用尖孢镰刀菌粗毒素定向筛选香蕉抗枯萎病材料,结果表明,多步筛选技术为最佳;郭和蓉等<sup>[34]</sup>应用尖孢镰刀菌粗毒素定向筛选玉女兰抗病性类原球茎时,也得出正向多步筛选法是可行的。林丛发等<sup>[31]</sup>、苏媛等<sup>[32]</sup>、杨媚等<sup>[35]</sup>、YERZHEBAYEVA等<sup>[36]</sup>应用逐级加压筛选技术分别得到了香蕉抗尖孢镰刀菌突变体、太子参抗叶斑病突变体、草莓抗镰刀菌突变体和甜菜抗尖孢镰刀菌突变体。本试验采用一

步选择法,将经EMS诱变后的康乃馨多花品种紫蝴蝶的细胞团接种在含临界致死浓度镰刀菌毒素粗提液的培养基上,反复筛选最终得到了抗尖孢镰刀菌的无性系植株。

对应用病原菌粗毒素压力选择的抗病性材料进行抗病性评价是十分必要的,而病原菌接种鉴定是最有效的手段<sup>[37]</sup>。本研究对筛选出的康乃馨品种紫蝴蝶小苗进行尖孢镰刀菌接种鉴定,发现其抗病无性系的抗病水平明显提高,为中抗。本研究结果为康乃馨抗病育种提供了新思路,同时也为无性系诱变及真菌粗毒素加压筛选抗病无性系提供了参考。本研究只采用了1个康乃馨品种,后期还需要开展其他康乃馨品种的筛选试验,以便将该技术进一步提升和改进。下一步将进一步深化和优化该技术,将会在完全分散的细胞中进行诱变处理和加压筛选,开展抗病性鉴定的同时进行分子生物学检测。

本研究建立的康乃馨愈伤组织悬浮培养体系,其增殖速率和生长曲线与李尊文<sup>[38]</sup>建立的芥蓝悬浮细胞培养体系结果类似,但本试验并未摸索悬浮培养起始质量、悬浮培养的适宜配方,这也是下一步需要进行探究的方向。

### 参考文献:

- [1] 郭志刚,张伟. 香石竹[M]. 北京:中国林业出版社,1996:1-2. GUO Z G, ZHANG W. Carnation[M]. Beijing: China Forestry Press,1996:1-2.
- [2] SAY M, KALC WRIGHT G, WIMALAJEEWA S. Epidemiology and control of *Fusarium* disease of carnations in Victoria [J]. Acta Horticulturae,1992,307:89-94.
- [3] ARDILA H D, TORRES A M, MARTÍNEZ S T, et al. Biochemical and molecular evidence for the role of class III peroxidases in the resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology,2014,85:42-52.
- [4] MELERO-VARA J M, LÓPEZ-HERRERA C J, PRADOS-LIGERO A M, et al. Effects of soil amendment with poultry manure on carnation *Fusarium* wilt in greenhouses in southwest Spain [J]. Crop Protection,2011,30(8):970-976.
- [5] SANT D, CASANOVA E, SEGARRA G, et al. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on *Fusarium* wilt and water usage in carnation grown on compost-based growth medium [J]. Biological Control,2010,53(3):291-296.
- [6] 王辉,孔宝华,李凡,等. 香石竹枯萎病菌室内药剂筛选 [J]. 云南农业大学学报,2007,22(1):57-60. WANG H, KONG B H, LI F, et al. Fungicides screening for the pathogen of carnation wilt disease in laboratory [J]. Journal of Yunnan Agricultural University,2007,22(1):57-60.
- [7] 常淑娟,马琴,曲文文,等. 芝麻枯萎病拮抗菌的分离、鉴定及

- 防效研究[J]. 河南农业科学, 2022, 51(8): 84-91.
- CHANG S X, MA Q, QU W W, et al. Isolation, identification and determination of control effect of antagonistic microorganisms against sesame *Fusarium* wilt[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2022, 51(8): 84-91.
- [8] 马红军, 胡春艳, 陈云坤, 等. 基于转录组学的丁香及甘草醇提取物对尖孢镰刀菌的影响[J]. 山西农业科学, 2023, 51(6): 682-689.
- MA H J, HU C Y, CHEN Y K, et al. Effects of clove and licorice extracts on *Fusarium oxysporum* based on transcriptomics [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2023, 51(6): 682-689.
- [9] 彭绿春, 杨秀梅, 苏艳, 等. 应用尖孢镰刀菌培养滤液室内鉴定香石竹品种抗病性初探[J]. 江西农业学报, 2011, 23(1): 106-107.
- PENG L C, YANG X M, SU Y, et al. A preliminary study on aseptic identification of resistance of carnation varieties to toxin filtrate from *Fusarium oxysporum* f. sp. diathii[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2011, 23(1): 106-107.
- [10] 赵杰, 田琼金, 聂蔓茹, 等. 红芸豆根腐病拮抗内生细菌的筛选和鉴定[J]. 山西农业科学, 2023, 51(10): 1226-1232.
- ZHAO J, TIAN Q J, NIE M R, et al. Screening and identification of antagonistic endophytic bacteria against pathogen of red kidney bean root rot[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2023, 51(10): 1226-1232.
- [11] 马红军, 胡春艳, 陈云坤, 等. 基于转录组学的丁香及甘草醇提取物对尖孢镰刀菌的影响[J]. 山西农业科学, 2023, 51(6): 682-689.
- MA H J, HU C Y, CHEN Y K, et al. Effects of clove and licorice extracts on *Fusarium oxysporum* based on transcriptomics [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2023, 51(6): 682-689.
- [12] 胡忠亮, 邹东霞, 黄敏仁, 等. 镰刀菌毒素滤液对转基因香石竹抗枯萎病性能的测定[J]. 科学技术与工程, 2016, 16(27): 131-136.
- HU Z L, ZOU D X, HUANG M R, et al. Determination of *Fusarium* wilt resistance dealt with *Fusarium* toxins filtrate on transgenic resistance of carnation[J]. Science Technology and Engineering, 2016, 16(27): 131-136.
- [13] LARKIN P J, SCOWCROFT W R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement[J]. TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik, 1981, 60(4): 197-214.
- [14] CARLSON P S. Methionine sulfoximine: resistant mutants of tobacco[J]. Science, 1973, 180(4093): 1366-1368.
- [15] 胡颖慧. 唐菖蒲根腐菌粗毒素的致毒作用及抗病无性系筛选[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- HU Y H. Toxic effect of crude toxin from gladiolus root rot fungus and screening of resistant clones[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2012.
- [16] 张应红. 丽格海棠抗茎腐病的生物学研究及 EMS 诱导的突变体筛选[D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.
- ZHANG Y H. Biological study on stem rot resistance of rieger begonia and screening of EMS-induced mutants[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2009.
- [17] 丁丁, 吕长平, 王继华, 等. 百合抗尖孢镰刀菌无性系的离体筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(1): 34-38.
- DING D, LÜ C P, WANG J H, et al. *In vitro* selection for lily clonal lines with *Fusarium oxysporum* f. sp. liliii toxin[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2011, 37(1): 34-38.
- [18] 刘君绍, 田时炳, 皮伟, 等. 茄子抗黄萎病突变体离体筛选 II. 突变体筛选[J]. 西南农业学报, 2003, 16(4): 102-106.
- LIU J S, TIAN S B, PI W, et al. Selection of eggplant mutants resistant to *Verticillium* wilt *in vitro* II. Selection of mutants [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2003, 16(4): 102-106.
- [19] 张喜春, LUTOVAL A, 韩振海, 等. 利用细胞筛选方法获得番茄抗晚疫病突变体的研究[J]. 园艺学报, 2000, 27(5): 377-379.
- ZHANG X C, LUTOVAL A, HAN Z H, et al. Study on the selection of tomato resistant mutant line to *Phytophthora infestans*(Mont.) de bary by cellular breeding[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27(5): 377-379.
- [20] 漆艳香, 谢艺贤, 蒲金基, 等. 海南省香蕉枯萎菌 nit 突变体的筛选及鉴定[J]. 热带作物学报, 2007, 28(3): 93-96.
- QI Y X, XIE Y X, PU J J, et al. The screening and identification of nit mutants of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2007, 28(3): 93-96.
- [21] 王继华, 陆琳, 唐开学. 香石竹尖孢镰刀菌 PCR 检测[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(4): 417-419.
- WANG J H, LU L, TANG K X. Detection of carnation wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. diathii) by pcr[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2004, 26(4): 417-419.
- [22] 权永辉. 百合体细胞胚的诱导及悬浮培养的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- QUAN Y H. Studies on somatic embryogenesis from cell suspension culture of *Lilium tenuifolium*(Oriental×Trumpet)[D]. Yanglin: Northwest Agriculture and Forestry University, 2013.
- [23] ZHANG Y P, JIANG S, QU S P, et al. *In vitro* selection for fusarium resistant oriental lily mutants using culture filtrate of the fungal agent[J]. Acta Horticulturae, 2014(1027): 205-212.
- [24] 台莲梅, 许艳丽, 闫凤云. 尖孢镰刀菌毒素对大豆幼根生理生化影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(11): 193-196.
- TAI L M, XU Y L, YAN F Y. The effect of toxin from *Fusarium oxysporum* on biochemical and physiological of soybean seedling root[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(11): 193-196.
- [25] 查夫拉 H S. 植物生物技术导论[M]. 许亦农, 麻密, 译. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- CHAWLA H S. Introduction to plant biotechnology[M]. XU Y N, MA M. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [26] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- FANG Z D. Research methods of plant diseases[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998.
- [27] 云南省质量技术监督局. 香石竹枯萎病抗性鉴定技术规程: DB53/T 798—2016[S]. 昆明: 云南省质量技术监督局, 2016.
- Yunnan Provincial Bureau of Quality and Technical Supervi-

- sion. Technical specification for identification of blight resistance of carnation; DB53/T 798-2016[S]. Kunming: Yunnan Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision, 2016.
- [28] SIROHI U, SHARMA S, KUMAR M, et al. An effective protocol for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cv. 'geolei' explants sterilization for successful callusing and shoot regeneration[J]. International Journal of Environment and Climate Change, 2021, 11: 230-238.
- [29] 程晓岩. 香石竹愈伤组织的诱导及遗传转化的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- CHENG X Y. Study on the callus induction and genetic transformation of dianthus *Caryophyllus* L. [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010.
- [30] 陆玉建, 张永磊. 绿萝离体快繁体系的建立及其甲基磺酸乙酯诱变条件[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(14): 55-60.
- LU Y J, ZHANG Y L. Study on rapid propagation system of *Epipremnum aureum* and its ethyl methanesulfonate mutation conditions[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(14): 55-60.
- [31] 林丛发, 钟爱清, 翁琳琳, 等. 利用叶斑病菌粗毒素离体筛选太子参抗叶斑病突变体[J]. 中国农学通报, 2010, 26(23): 42-47.
- LIN C F, ZHONG A Q, WENG L L, et al. *In vitro* screening of resistant mutants to Taizishen leaf spot with crude *Phyllosticta commonsii* toxin[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(23): 42-47.
- [32] 苏媛, 刘雪静, 尹宝重, 等. 利用枯萎病菌粗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.
- SU Y, LIU X J, YIN B Z, et al. Screening of strawberry *Fusarium* wilt resistant mutants by *Fusarium oxysporum* toxin[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(10): 158-161.
- [33] 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.
- LIU H R, XU W Y, LIN C H. Screening the resistant mutants to banana vascular wilt using the crude toxins of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense[J]. Subtropical Agriculture Research, 2007, 3(3): 231-234.
- [34] 郭和蓉, 张腾, 袁红丽, 等. 利用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子辐射和尖孢镰刀菌毒素筛选杂交兰抗茎腐病突变体[J]. 核农学报, 2021, 35(12): 2688-2695.
- GUO H R, ZHANG T, YUAN H L, et al. Screening mutants resistant to stem rot using  $^{12}\text{C}^{6+}$  heavy ion beam irradiation and crude toxin of *Fusarium oxysporum* in hybrid *Cymbidium*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(12): 2688-2695.
- [35] 杨媚, 舒灿伟, 陈健仪, 等. 利用甲基磺酸乙酯和枯萎病菌毒素诱变筛选香蕉抗毒素突变体[J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1465-1470.
- YANG M, SHU C W, CHEN J Y, et al. Screening of mutants resistant to the toxin produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense using ethyl methane sulfonate and toxin mutagenesis techniques[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(8): 1465-1470.
- [36] YERZHEBAYEVA R S, ABEKOVA A M, BERSIMBAEVA G H, et al. *In vitro* cell selection of sugar beet for resistance to culture filtrate of the fungus *Fusarium oxysporum*[J]. Cytology and Genetics, 2019, 53(4): 307-314.
- [37] 张庆华, 过聪, 向发云, 等. 利用EMS和炭疽病粗毒素诱变筛选草莓抗炭疽病突变体[J]. 北方园艺, 2020(1): 7-12.
- ZHANG Q H, GUO C, XIANG F Y, et al. Screening of strawberry mutants resistant to anthracnose disease using ethyl methane sulphonate (EMS) and toxin mutagenesis techniques[J]. Northern Horticulture, 2020(1): 7-12.
- [38] 李尊文. 芥蓝悬浮细胞培养的初步研究与ABD2的遗传转化[D]. 福州: 福建农林大学, 2022.
- LI Z W. Preliminary study on suspension cell culture of Chinese Kale and genetic transformation of ABD2[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2022.