



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104335902 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 11

(21) 申请号 201410651909. 3

(22) 申请日 2014. 11. 17

(71) 申请人 琼州学院

地址 572000 海南省三亚市育才路 1 号

申请人 王沛政

(72) 发明人 王沛政 冯慧敏 陈友 武耀廷

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

A01H 1/06 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法。巴西蕉茎尖薄片的 EMS 诱变及枯萎病菌粗毒素连续筛选育种技术, 利用香蕉茎尖薄片为外植体, 先对其进行化学诱变处理, 获得再生植株; 再生植株再以香蕉茎尖薄片在枯萎病粗毒素为选择压力进行抗性诱导和筛选, 香蕉薄片诱导组合为以 4mg/L 的 6-BA 和 0. 2mg/L 的 IAA 激素配合, EMS 处理以 200mMol/L 浓度和处理 30min; 得到存活香蕉苗继续以茎尖薄片在香蕉枯萎病粗毒素为选择压力进行连续枯萎病抗性筛选, 进而显著提高香蕉植株枯萎病抗性, 平均提高 25%-30%, 实现本发明培育枯萎病抗性香蕉植株所需时间较短、效率较高, 具有广泛的应用价值。

1. 一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法,其特征在于,采用的方法步骤具体如下:

(1)巴西蕉茎尖薄片的EMS诱变:将直接购买的巴西蕉(Musa AAA Cavendish subgroup CV. Brazil)吸芽在无菌条件下将切好的巴西蕉茎尖2-3mm左右薄片,其中根部薄片弃之,直接泡在含EMS诱变剂中处理30min;

(2)香蕉茎尖薄片的枯萎病粗毒素多轮连续筛选:经EMS突变处理后的巴西蕉茎尖薄片植入到设置的培养基中,在27℃,光照周期12(光照)/12(黑暗)条件下培养30天,诱导出再生植株;将存活的再生植株继续切成薄片加有含40μg/ml镰刀菌酸浓度的香蕉枯萎病粗毒素的上述设置的培养基为选择压力诱导再生植株,同样条件培养,诱导出再生植株再切成薄片以同样条件连续筛选诱导7轮,PH至5.8;

所述的设置培养基含MS基本盐+30g/L蔗糖+6.5g/L琼脂粉+改良的维生素/氨基酸溶液+4mg/L的6-BA和0.2mg/L的IAA;

(3)再生苗生根:连续筛选诱导7轮后的无菌苗接入生根培养基,40天后长出完整根系后方可进行炼苗,并最终获得枯萎病抗性得到显著提高的香蕉苗植株。

2. 如权利要求1所述的一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法,其特征在于,巴西蕉茎尖切好为2-3mm左右薄片,直接泡在含EMS 200mMol/L浓度的诱变剂中;EMS 200mMol/L浓度配置采用:将EMS原液先用无菌水稀释,再用0.1mol/L,Ph=5.6的磷酸缓冲液稀释。

3. 如权利要求1所述的一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法,其特征在于,所述的改良的维生素/氨基酸溶液配方:1.19μmol/L的维生素B1,0.97μmol/L的维生素B6,0.13μmol/L的D-泛酸钙,1.62μmol/L的烟酸,0.01μmol/L的叶酸,26.64μmol/L的甘氨酸,113.57μmol/L的抗坏血酸,0.07μmol/L的氨基苯酸,56.82μmol/L的L-半胱氨酸,0.011μmol/L的核黄素,555.06μmol/L的肌醇,370.94μmol/L的硫酸腺嘌呤,551.88μmol/L的酪氨酸。

4. 如权利要求1所述的一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法,其特征在于,所述的香蕉枯萎病菌粗毒素液采用,将香蕉枯萎病4号生理小种(*F. oxysporum f. sp. cubense 4*)在查彼氏培养基于(25±2)℃,120r/min的振荡摇床中培养12d,滤去菌丝后,滤液经8000rpm离心20min,取上清液无菌过滤,滤液即为粗毒素液,-20℃保存备用。

5. 如权利要求1所述的一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法,其特征在于,所述的生根培养基配方采用MS基本盐+0.3mg/L 6-BA+0.2mg/L IAA+3%蔗糖+0.7%琼脂+10%椰子水,PH至5.8。

一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体说,本发明具体涉及一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的技术领域,进一步讲本发明涉及一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法育种技术领域。

背景技术

[0002] 香蕉 (*Musa spp.*) 是世界上最重要的水果之一,据 FAO 统计,2011 年全球种植香蕉面积达到 515.8 万 hm^2 (FAO. FAOSTAT) [1]。香蕉也是海南重要的经济作物,种植面积居全国第 3 位,产量居全国第 2 位 [2]。目前香蕉枯萎病对我国和世界的香蕉生产构成严重威胁 [3-5],尤其是香蕉枯萎病 FOC-TR4 严重危害香蕉卡文迪许 (Carendish) 栽培种 [3, 4]。现已明确由 4 号生理小种引发的香蕉枯萎病主要分布于热带、亚热带地区 [6-8]。现已蔓延至我国大部分香蕉种植产区 [5, 9]。

[0003] 防治香蕉枯萎病的方法主要有生物防治、化学防治、抗病品种选育、轮作以及土壤消毒等。病原菌容易对化学药剂产生抗药性,药剂残留也会导致环境污染和食品安全等问题;常规抗病品种选育周期不但长,且抗病性与农艺性状很难兼顾;轮作和土壤消毒在实际生产中并未取得有效防治效果 [10-12]。在亚洲许多育种家利用卡文迪许栽培种进行组培,利用随机其产生的诱变中选择到对 FOC-TR4 有部分抗性的香蕉品种,在病区进行轮作等措施,产生了一定的效果 [13-15]。Matsmoto [16] 等将香蕉枯萎病菌的主要成分镰刀菌酸添加到组织培养基中来筛选耐病菌毒素的香蕉突变体,并进一步用病菌与香蕉组织共培养方法获得了病菌毒素,最终以病菌毒素为选择压筛选得到了抗香蕉枯萎病菌 1 号小种的突变体。已有研究大都利用香蕉组培苗一代诱变和一代筛选,或者直接利用多芽体为材料筛选,这都需要进行海量的筛选才有可能选到目标材料,费用高、效率很低,而且海量的筛选也是很多实验室难以承受的。利用巴西蕉茎尖薄片的 EMS 诱变是香蕉体细胞诱变,能与诱变剂充分接触,诱变后再分化形成茎尖,保证了诱变效率。诱变后的香蕉茎尖薄片的枯萎病菌粗毒素连续筛选可节约薄片长到茎尖时所需要的时间,目前未见有关报道。因此一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法目前未见报道。

[0004] 参考文献:

[1]FAO. FAOSTAT. [http:// faostat. fao. org/](http://faostat.fao.org/), January 16, 2013.

[0005] [2] 海南省统计局. 海南统计年鉴(1989-2009) [M]. 北京:中国统计出版社。

[0006] [3]Ploetz R C. Fusarium Wilt of Banana Is Caused by Several Pathogens Referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. *Phytopathology*. 2006, 96(6):653-656.

[0007] [4]Paul J Y, Becker D K, Dickman M B, et al. Apoptosis-related genes confer resistance to *Fusarium wilt* in transgenic 'Lady Finger' bananas [J]. *Plant Biotechnol J*. 2011, 9(9):1141-8.

[0008] [5] 吴元立. 香蕉镰刀菌枯萎病综述 [J]. *广东园艺*, 2003, 4(1):8-9.

- [0009] [6]Kazzaz M K, Fadly G B, Hassan M A A, et al. Identification of some *Fusarium* spp. using molecular biology techniques[J]. Egyptian Journal of Phytopathology, 2008,36(1):57-69.
- [0010] [7]Fourie G, Steenkamp E T, Ploetz R C, et al. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex[J]. Infection Genetics and evolution, 2011,11(3):533-542.
- [0011] [8]Hwang, S C, and Ko W H. Somaclonal resistance in Cavendish banana to fusarium wilt. Plant prot. Bull.1991,33(1):124-132.
- [0012] [9] 蒲金基, 刘晓妹, 曾会才. 香蕉抗枯萎病育种研究进展 [J]. 中国南方果树, 2003,32(1):31-34.
- [0013] [10] 林兰稳, 奚伟鹏, 黄赛花. 香蕉镰刀菌枯萎病防治药剂的筛选 [J]. 生态环境, 2003,12(2):182-183.
- [0014] [11] 胡伟, 赵兰凤, 张亮, 等. 不同种植模式配施生物有机肥对香蕉枯萎病的防治效果研究 [J]. 植物营养与肥料学报, 2012,18(3):742-748.
- [0015] [12] 李国良, 姚丽贤, 杨苞梅, 等. 有机肥与生防菌结合防治香蕉枯萎病的初步研究 [J]. 中国土壤与肥料, 2012, (2):67-72.
- [0016] [13]Butler D. Fungus threatens top banana[J]. Nature. 2013, 504(7479):195-6.
- [0017] [14]Hont A D, Denoeud F, Aury J M et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants[J]. Nature. 2012, 488(7410):213-217.
- [0018] [15] MATSMOTO K, SOUZA LA C, BARBOSAM L. In vitro selection for *Fusarium* wilt resistance in banana, co-cultivation technique to produce culture filtrate of race 1 *Fusarium oxysporum*. f sp. *cubense*[J]. Fruits, 1999,54(2):97-102.
- [0019] [16] Okole BN, Schultz FA. Micro-cross sections of banana and plantains: morphogenesis and regeneration of callus and shoot buds[J]. Plant Sci, 1996,116:185-195.

发明内容

[0020] 针对现有技术中未见有关利用巴西蕉茎尖薄片的 EMS 诱变及枯萎病菌粗毒素连续筛选育种技术提高香蕉植株枯萎病抗性的方法的技术现状。本发明旨在提供一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法, 通过巴西蕉茎尖薄片的 EMS 诱变及枯萎病菌粗毒素连续筛选育种技术, 进而显著提高香蕉植株枯萎病抗性, 获得改良的香蕉枯萎病抗性植株。本发明培育枯萎病抗性香蕉植株效率较高、所需时间较短, 具有重要应用价值。

[0021] 本发明采用的主要技术方案:

本发明巴西蕉茎尖薄片的 EMS 诱变及枯萎病菌粗毒素连续筛选育种技术, 利用香蕉茎尖薄片为外植体, 先对其进行化学诱变处理, 获得再生植株; 再生植株再以香蕉茎尖薄片在枯萎病菌粗毒素为选择压力进行抗性诱导和筛选; 得到的存活香蕉苗继续以茎尖薄片在香蕉

枯萎病粗毒素为选择压力进行连续枯萎病抗性筛选,进而显著提高香蕉植株枯萎病抗性,抗病性平均提高 25%-30%,实现本发明培育枯萎病抗性香蕉植株所需时间较短、效率较高,获得显著的技术效果,具有广泛的应用价值。

[0022] 本发明具体提供一种利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法,采用的方法步骤具体如下:

(1)巴西蕉茎尖薄片的EMS诱变:将直接购买的巴西蕉(Musa AAA Cavendish subgroup CV. Brazil)吸芽在无菌条件下将切好的巴西蕉茎尖 2-3mm 左右薄片,其中根部薄片弃之,直接泡在含 EMS 200mMol/L 浓度的诱变剂中处理 30min;EMS 200mMol/L 浓度配置采用将 EMS 原液先用无菌水稀释,再用 0.1mol/L, Ph=5.6 的磷酸缓冲液稀释。

[0023] (2)香蕉茎尖薄片的枯萎病粗毒素多轮连续筛选:经 EMS 突变处理后的巴西蕉茎尖薄片植入到设置的培养基中,在 27°C,光照周期 12(光照)/12(黑暗)条件下培养 30 天,诱导出再生植株;将存活的再生植株继续切成薄片加有含 40μg/ml 镰刀菌酸浓度的香蕉枯萎病粗毒素的上述设置的培养基为选择压力诱导再生植株,同样条件培养,诱导出再生植株再切成薄片以同样条件连续筛选诱导至 7 轮,PH 至 5.8。

[0024] 所述的设置培养基含 MS 基本盐+30g/L 蔗糖+6.5g/L 琼脂粉+改良的维生素/氨基酸溶液+4mg/L 的 6-BA 和 0.2mg/L 的 IAA。

[0025] 所述改良的维生素/氨基酸溶液配方:1.19μmol/L 的维生素 B1,0.97μmol/L 的维生素 B6,0.13μmol/L 的 D-泛酸钙,1.62μmol/L 的烟酸,0.01μmol/L 的叶酸,26.64μmol/L 的甘氨酸,113.57μmol/L 的抗坏血酸,0.07μmol/L 的氨基苯酸,56.82μmol/L 的 L-半胱氨酸,0.011μmol/L 的核黄素,555.06μmol/L 的肌醇,370.94μmol/L 的硫酸腺嘌呤,551.88μmol/L 的酪氨酸。

[0026] 香蕉枯萎病菌粗毒素液:香蕉枯萎病 4 号生理小种(*F. oxysporum* f. sp. cubense 4)在查彼氏培养基于(25±2)°C,120r/min 的振荡摇床中培养 12d,滤去菌丝后,滤液经 8000rpm 离心 20min,取上清液无菌过滤,滤液即为粗毒素液,-20°C 保存备用。

[0027] (3)再生苗生根:连续筛选诱导 7 轮后的无菌苗接入生根培养基,40 天后长出完整根系后方可进行炼苗,并最终获得枯萎病抗性得到显著提高的香蕉苗植株。

[0028] 生根培养基配方采用 MS 基本盐+0.3mg/L 6-BA+0.2mg/L IAA+3% 蔗糖+0.7% 琼脂+10% 椰子水,PH 至 5.8。

[0029] 通过上述利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法技术步骤可显著提高香蕉植株枯萎病抗性,效率高、获得枯萎病抗性香蕉植株时间短。

[0030] 本发明中,采用的 EMS 原液、MS 基本盐、6-BA 和 IAA 都是本领域常见的选用对象,选用的查彼氏培养基也是本领域常见的培养基。

[0031] EMS: 甲基磺酸乙酯。

[0032] MS 基本盐:其中大量元素: NH_4NO_3 1650mg/L, KNO_3 1900 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370 mg/L, KH_2PO_4 700 mg/L, 微量元素: KI 0.83 mg/L, H_3BO_3 6.2 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6 mg/L, $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (27.8)+ $\text{Na}_2\text{-EDTA}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (37.3)mg/L。

[0033] 6-BA: 6-苄氨基腺嘌呤。

[0034] IAA: 吲哚乙酸。

[0035] 查彼氏培养基成分：NaNO₃ 3g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, KCl 0.5g, FeSO₄·0.01g, 蔗糖 30g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000mL。

[0036] 通过实施本发明具体的技术指标,实现本发明内容,可以达到以下有益效果：

(1) 采用本发明提供的 2-3mm 香蕉茎尖薄片,靠近根部薄片弃之后,直接泡在含 EMS 诱变剂溶液中,与直接浸泡香蕉茎尖相比有利于诱变剂与薄片植物细胞充分接触,提高诱变效果。

[0037] (2) 再此基础上,香蕉茎尖薄片直接以枯萎病粗毒素筛选,比利用幼苗进行枯萎病粗毒素筛选,抗逆性选择压更高,同时也省去了幼苗筛选步骤,节约了该阶段的筛选时间;通过 7 轮枯萎病抗性连续筛选,香蕉枯萎病平均发病率提高了 25-30%,效果显著。

[0038]

具体实施方式

[0039] 下面,举实施例说明本发明,但是,本发明并不限于下述的实施例。

[0040] 本发明中涉及到的主要原辅材料和设备有：

主要原辅材料:香蕉巴西苗是海南当地成熟商品品种,可以通过市场购买获得。育苗袋:10cm*12cm,底部侧部打孔的营养袋。

[0041] 主要试剂:蔗糖,琼脂粉,维生素 B1,维生素 B6, D- 泛酸钙,烟酸,叶酸,甘氨酸,抗坏血酸,氨基苯酸, L- 半胱氨酸,核黄素,肌醇,硫酸腺嘌呤,酪氨酸;采用的 EMS 原液、MS 基本盐、6-BA 和 IAA 都是本领域常见的选用对象,选用的查彼氏培养基也是本领域常见的培养基。

[0042] LRH-150-G 型光照培养箱(上海仪器厂);超净工作台(苏净安泰)医用高压蒸汽灭菌锅(日本三洋),可调移液器(eppendor)、美国纯水系统(Milib)。

[0043] 本发明中选用的所有原辅材料,所选用的所有试剂和仪器都为本领域熟知选用的,但不限制本发明的实施,其他本领域熟知的一些试剂和设备都可适用于本发明以下实施方式的实施。

[0044] 实施例一:利用香蕉茎尖薄片显著提高香蕉植株枯萎病抗性的方法

利用香蕉茎尖薄片提高香蕉植株枯萎病抗性的方法采用的步骤具体如下：

(1) 巴西蕉茎尖薄片的 EMS 诱变:将直接购买的巴西蕉(Musa AAA Cavendish subgroup CV. Brazil) 吸芽在无菌条件下,将切好的巴西蕉茎尖 2-3mm 薄片,其中根部薄片弃之,直接泡在含 EMS 200mMol/L 浓度的诱变剂中处理 30min;EMS 200mMol/L 浓度配置采用将 EMS 原液先用无菌水稀释,再用 0.1mol/L, pH=5.6 的磷酸缓冲液稀释。

[0045] (2) 香蕉茎尖薄片的诱导:经 EMS 突变处理后的巴西蕉茎尖薄片植入到设置培养基中,PH 至 5.8,在 27℃,光照周期 12 (光照)/12 (黑暗) 条件下培养 30 天,诱导出再生植株;巴西蕉茎尖薄片按照 1000 个左右薄片,每瓶 5 个植入到设置的培养基中。

[0046] 所述的设置培养基含 MS 基本盐 + 30g/L 蔗糖 + 6.5g/L 琼脂粉 + 改良的维生素 / 氨基酸溶液 + 4mg/L 的 6-BA 和 0.2mg/L 的 IAA。

[0047] 所述改良的维生素 / 氨基酸溶液配方:1.19μmol / L 的维生素 B1,0.97μmol / L 的维生素 B6,0.13μmol / L 的 D- 泛酸钙,1.62μmol / L 的烟酸,0.01μmol / L 的叶酸,26.64μmol / L 的甘氨酸,113.57μmol / L 的抗坏血酸,0.07μmol / L 的氨基苯酸,

56.82 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 的 L-半胱氨酸,0.011 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 的核黄素,555.06 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 的肌醇,370.94 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 的硫酸腺嘌呤,551.88 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 的酪氨酸。

[0048] (3) 茎尖薄片的枯萎病粗毒素多次连续筛选:上一步存活的再生植株继续切成 1000 个左右薄片,以上述培养基加有含 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 镰刀菌酸浓度的香蕉枯萎病粗毒素为选择压力诱导再生植株,同样条件培养,诱导出生长再生植株再切成 1000 个左右薄片以上述培养基加有香蕉枯萎病粗毒素诱导连续筛选诱导至 7 轮。

[0049] (4) 再生苗生根:连续筛选诱导 7 轮后的无菌苗接入生根培养基,40 天后长出完整根系后方可进行炼苗。

[0050] 生根培养基配方采用 MS 基本盐 +0.3mg/L 6-BA+0.2mg/L IAA+3% 蔗糖 +0.7% 琼脂 +10% 椰子水,PH 至 5.8。

[0051] (5) 最终获得枯萎病抗性得到显著提高的香蕉苗植株:在遮阳大棚中打开已经生根的香蕉苗瓶盖驯化,3 天后将幼苗从培养瓶中轻轻取出,用自来水洗净幼苗根部的培养基,将把幼苗植入配置好的营养土中(市场上的普通花土:椰糠=1:1)的育苗袋中并压实,种植后浇足水,以后每隔 2-3 天浇一次水;定植后 7d 内棚内空气湿度应保持在 95% 左右,温度 26 度左右;7 天后通风排气,降低空气湿度,减少真菌病害发生的可能;当植株长有 10 片叶时,且生长健壮,根系发达,即可进行植株的枯萎病抗性鉴定。

[0052] 选取较为健壮的 300 株香蕉苗,同时以市场买来同样时期的香蕉苗 300 为对照,没处理 100 株,三重复,每株接种体用量为 5ml,分生孢子悬浮液浓度为 4×10^6 孢子/ml;将枯萎病菌滤液浸泡受伤根系香蕉苗 2 小时,30-50d 后开始调查发病情况。

[0053] 上述枯萎病抗性的鉴定表明,处理间差异不显著,不同处理对照香蕉苗枯萎病发病率在 97%-99% 之间,平均发病 98.4%,经筛选后的其不同处理香蕉苗枯萎病发病率在 70%-73% 之间,平均发病率 73.0%,与未经筛选的对照相比枯萎病抗性提高了 25%-30%。以上结果表明最终获得的香蕉苗枯萎病抗性提高效果显著。

[0054] 实施例二:利用香蕉茎尖薄片显著提高香蕉植株枯萎病抗性的方法,筛选时间较短。

[0055] 按以下具体诱变方法:

(1) 巴西蕉茎尖薄片的 EMS 诱变:将直接购买的巴西蕉(Musa AAA Cavendish subgroup CV. Brazil) 吸芽在无菌条件下,将切好的巴西蕉茎尖 2-3mm 薄片 2500 个左右,其中靠近根部薄片弃之,分批直接泡在含 EMS 200mMol/L 浓度的诱变剂中处理 30min。完成该过程需要 1 天时间。

[0056] (2) 香蕉茎尖薄片的诱导:经 EMS 突变处理后的巴西蕉茎尖薄片植入到设置培养基中,PH 至 5.8,在 27 $^{\circ}\text{C}$,光照周期 12 (光照)/12 (黑暗) 条件下培养 30 天,诱导出生长再生植株;巴西蕉茎尖薄片按照 1000 个左右薄片,每瓶 5 个植入到设置的培养基中。完成该过程需要约 30 天时间。

[0057] (3) 茎尖薄片的枯萎病粗毒素多次连续筛选:上一步存活的再生植株继续切成 1000 个左右薄片,以上述培养基加有含 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 镰刀菌酸浓度的香蕉枯萎病粗毒素为选择压力诱导再生植株,需要 30 多天时间;诱导出生长的再生植株再切成 1000 个左右薄片以上述培养基加有香蕉枯萎病粗毒素诱导连续筛选诱导至 7 轮,需要 210 多天时间。

[0058] (4) 再生苗生根:连续筛选诱导 7 轮后的 1000 株左右的无菌苗接入生根培养基,

40 天后长出完整根系后方可进行炼苗。完成该过程需要约 50 天时间。

[0059] (5) 炼苗 : 最终获得枯萎病抗性得到显著提高的香蕉苗植株 : 在遮阳大棚中打开已经生根的香蕉苗瓶盖驯化, 3 天后将幼苗从培养瓶中轻轻取出, 用自来水洗净幼苗根部的培养基, 将把幼苗植入配置好的营养土中(市场上的普通花土 : 椰糠 =1 : 1) 的育苗袋中并压实, 种植后浇足水, 以后每隔 2-3 天浇一次水 ; 定植后 7d 内棚内空气湿度应保持在 95% 左右, 温度 26 度左右 ; 7 天后通风排气, 降低空气湿度, 减少真菌病害发生的可能。完成该过程需要约 20 天时间。

[0060] (6) 枯萎病抗性鉴定 : 选取较为健壮的 300 株香蕉苗, 同时以市场买来同样时期的香蕉苗 300 为对照, 没处理 100 株, 三重复, 每株接种体用量为 5ml, 分生孢子悬浮液浓度为 4×10^6 孢子 /ml ; 将枯萎病菌滤液浸泡受伤根系香蕉苗 2 小时, 30-50d 后开始调查发病情况。该过程需要约 50 天。

[0061] 统计以上香蕉薄片枯萎病抗性筛选 7 轮时间, 不包括第六步枯萎病抗性鉴定, 共需要大约为 310 多天, 大约为 1 年时间。

[0062] 设置对照, 其具体方法如下 :

(1) 巴西蕉茎尖薄片的 EMS 诱变 : 同上。完成该过程需要 1 天时间。

[0063] (2) 香蕉茎尖薄片的诱导 : 同上。完成该过程需要约 30 天时间。

[0064] (3) 第一轮枯萎病抗性筛选 : 上一步存活的再生植株继续切成 2-3mm 个左右薄片, 以上述培养基不加镰刀菌酸直接诱导再生植株, 需要 20 多天时间 ; 诱导出的再生植株按如下方法继续。

[0065] 再生苗生根, 同以上步骤 4。完成该过程需要约 50 天时间。

[0066] 炼苗 : 同以上步骤 5。完成该过程需要约 20 天时间。

[0067] 枯萎病抗性筛选 : 同以上步骤 6。该过程需要约 50 天。

[0068] (4) 枯萎病抗性筛选 2 轮 : 上一步存活的再生植株灭菌后重复上述步骤 3。该过程需要天数同上 150 天。该轮不同处理对照香蕉苗枯萎病发病率在 90%-94% 之间, 平均发病 92% 左右。统计对照香蕉薄片枯萎病抗性筛选 2 轮共需要时间大约为 320 多天, 大约为 1 年时间。

[0069] 结论 : 两者相比对照方法枯萎病菌筛选 2 轮需要 320 天, 最终获得的香蕉苗枯萎病发病率在 92% 左右。而本专利方法枯萎病菌粗毒素筛选 7 轮需要 310 天, 最终获得的香蕉苗枯萎病发病率在 73% 左右。