

非致病性尖镰孢 FO47 的原生质体融合改良研究

李春玲, 宋赵依, 宗兆锋

(西北农林科技大学 植保学院与陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】改良非致病性尖镰孢 FO47 的综合性状, 获得具有较好防效的生防菌株。【方法】利用原生质体融合技术, 将非致病性尖镰孢 FO47 和生防放线菌 153 进行融合, 通过形态特征和菌落直径生长情况对融合菌株进行初筛, 并采用西瓜苗期生长发育、防病效果和抗药性试验对所获得的初筛菌株进行复筛。【结果】筛选出 14 株菌落直径较 FO47 生长快的再生菌株, 其中菌株 F1-35、F1-38、F1-1 和 F1-41 能够促进幼苗生长, 菌株 F1-35 处理西瓜幼苗后单株鲜质量较 FO47 提高了 36.93%, 根长较 FO47 增加了 19.07%。菌株 F1-35、F1-38 和 F1-4 对西瓜枯萎病的防治效果超过 50%, 其中菌株 F1-35 的防治效果最好, 达到 59.04%。菌株 F1-4 对多菌灵表现出较高的抗性, 说明菌株 F1-4 可以与低质量浓度多菌灵混合使用防治西瓜枯萎病。【结论】筛选出 3 株综合性状得到提高的再生菌株, 说明原生质体融合是改良生防菌株的有效手段。

【关键词】 非致病性尖镰孢 FO47; 生防放线菌 153; 原生质体融合

【中图分类号】 S476⁺.8; Q933

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)10-0126-05

The improvement of *Fusarium oxysporum* FO47 by protoplast fusion

LI Chun-ling, SONG Zhao-yi, ZONG Zhao-feng

(College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to improve the biocontrol character of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* FO47. 【Method】 Protoplast fusion was carried out between FO47 and biocontrol actinomycetes 153. The recombinants were selected based on morphological and cultural character, colony diameter, greenhouse pot experiment and resistance to carbendazim. 【Result】 Fourteen recombinants were selected because the growth rates of colonies were faster than that of FO47. Strains F1-35, F1-38, F1-1 and F1-41 could promote the growth of the seedlings of watermelon. The fresh weight of seedlings of watermelon treated by strain F1-35 was more than 36.93%, and the length of root was more than 19.07% compared to strain FO47. The control effects of strain F1-35, F1-38 and F1-4 were more than 50%. The control effect of strain F1-35 was 59.04% and was the best. Strain F1-4 showed more resistance to carbendazim. The integration of strain F1-4 and low concentration of carbendazim was used to control *F. oxysporum* f. sp. *niveum*. 【Conclusion】 Three strains with excellent characters were selected indicating. Protoplast fusion is an effective tool to improve wild strains and the foundation of biocontrol of plant diseases.

Key words: *Fusarium oxysporum* FO47; biocontrol actinomycetes 153; protoplast fusion

在植物病害生物防治中, 首先需要从自然界中 分离筛选出有效的生防菌株, 而这些野生菌株在长

* [收稿日期] 2010-03-31

[基金项目] 教育部创新团队发展计划项目(200558); 国家高等学校学科创新引智计划项目(B07049); 西北农林科技大学创新团队项目

[作者简介] 李春玲(1984—), 女, 辽宁大石桥人, 在读硕士, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: lichunling1984@126.com

[通信作者] 宗兆锋(1956—), 男, 陕西泾阳人, 教授, 主要从事植物病害生物防治研究。

期进化过程中表现出防病效果不稳定、抗病性差等特点,因此,需要对其进行改良,以提高其防病能力,增强对环境的适应性。目前,西北农林科技大学病害生物防治实验室已分离筛选出多种具有一定生防效果的放线菌^[1-3],其中菌株 153 对常见病原真菌有较强的持续抑菌作用^[4],对抗生素和杀菌剂表现出较强的耐受性且定殖能力强^[5],其发酵液对植物的生长有促进作用^[5]。非致病性尖镰孢 FO47 是生防真菌,可以有效防治由尖镰孢菌引起的多种植物枯萎病^[6-8],且对植株生长有促进作用^[9],但对多菌灵敏感。本研究采用原生质体融合技术对非致病性尖镰孢 FO47 和生防放线菌 153 进行融合,通过形态培养特征、菌落直径、温室盆栽试验和抗药性试验对融合菌株进行筛选,以期获得高效的生防菌株,为植物病害的生物防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

非致病性尖镰孢 FO47,由法国农艺研究院(INRA)Dijon 研究中心 Alabouvette 博士赠予。生防放线菌 153,由西北农林科技大学病害生物防治实验室从土壤中分离得到。试剂:溶菌酶、蜗牛酶、溶壁酶等,由杨凌宝鑫生物公司提供。

1.2 原生质体融合

1.2.1 FO47 原生质体的制备 将 FO47 制成浓度为 10^6 cfu/mL 的孢子悬浮液,取 0.2 mL 加入 50 mL PDB 培养液中,在 25 ℃、150 r/min 下振荡培养,3 h 后离心收集菌丝体并加入酶解液,35 ℃ 恒温振荡以产生原生质体,2 h 后 3 000 r/min 离心 10 min,沉淀原生质体,加入高渗缓冲液备用。

1.2.2 生防放线菌 153 原生质体的制备 将生防放线菌 153 接种于 30 mL 菌丝培养液中,在 25 ℃、150 r/min 振荡培养 72 h,取 5 mL 培养液离心收集菌丝体,将其悬浮于磷酸缓冲液中,离心收集后加入酶解液,35 ℃ 恒温振荡以产生原生质体,2 h 后差速离心^[10]收集原生质体,加入磷酸缓冲液备用。

1.2.3 原生质体灭活 将上述制备的原生质体分成 4 份:1 份在 55 ℃ 下热灭活,1 份在紫外线下灭活,1 份为超声波处理,1 份未做任何处理。

1.2.4 原生质体融合 将上述灭活处理的原生质体悬浮液两两等量混合,在 35 ℃ 条件下,加入 35% PEG6000 进行融合,10 min 后加入高渗缓冲液终止反应后离心,弃去上清液,将重新悬浮的原生质体涂于再生培养基上,28 ℃ 培养,使其再生。

1.3 再生菌株的筛选

1.3.1 菌落形态特征及菌落直径的测定 以未处理的原生质体为对照,根据再生培养基上的菌落形态特征初步筛选出再生菌株,再经过继代培养获得遗传性状稳定的菌株。将筛选出的再生菌株、亲本 FO47 和西瓜枯萎菌置于 PDA 平板上,于 25 ℃ 培养 5 d 后,取直径 5 mm 的菌饼置于新鲜 PDA 平板上,28 ℃ 条件下培养 24 h 后测量菌落直径,每隔 12 h 测量 1 次。每个处理重复 3 次。

1.3.2 再生菌株对西瓜苗期生长发育的影响 将再生菌株和 FO47 在 Czapek 培养液中,于 25 ℃ 条件下振荡培养 3 d 后,将培养液浇灌于培养钵中并与土壤充分混合,接种量为 2×10^7 cfu/g。西瓜种子表面消毒后于 28 ℃ 条件下催芽,播种于含培养液的土壤中,按常规方法栽培管理,定期测定植株生长情况,记录蔓长、根长和单株鲜质量。以只接种空白发酵液为对照。

1.3.3 再生菌株对西瓜苗期枯萎病的防治 待西瓜第 1 片真叶展平后,采用伤根吸液法^[11]接种西瓜枯萎病菌,接种量为 10^6 cfu/mL。待西瓜种子常规播种 25 d 后记载发病率,计算病情指数及防病效果。以只接种空白发酵液为对照。

病情指数 = $\frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{各级代表级值})}{\text{叶片总数} \times \text{最高代表级值}} \times 100$,

防病效果 = $(\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}) / \text{对照组病情指数} \times 100\%$ 。

1.3.4 再生菌株对多菌灵的抗药性测定 非致病性尖镰孢 FO47 临界药剂质量浓度的确定:用 50% 多菌灵制成质量浓度分别为 1, 2, 3, 4, 5, 50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 PDA 含药平板。将 FO47 在 PDA 上培养 5 d 后,取直径 5 mm 的菌饼置于上述各处理的含药平板中,25 ℃ 条件下培养 7 d,检查各处理菌落的生长情况,确定临界药剂质量浓度。

再生菌株抗药性的筛选:按照 FO47 临界药剂质量浓度制成 PDA 含药平板,将 FO47 和再生菌株在 PDA 上培养 5 d 后,取直径 5 mm 的 FO47 和再生菌株菌饼分别置于上述含药平板中,25 ℃ 条件下培养 7 d,检查各菌落的生长情况。对于明显产生抗药性的菌株重复处理 3 代,以确定其抗药性。

2 结果与分析

2.1 再生菌株的形态特征和菌落直径

试验发现,经过酶解处理后双亲均产生足够数量的原生质体,根据损伤互补原则,依据菌丝的颜色

和形态、可溶性色素的有无及颜色等培养特征,筛选出 25 株性状稳定的再生菌株。将初筛获得的菌株和亲本 FO47 进行培养,测定菌落直径,结果如表 1 所示。由表 1 可见,筛选出的 14 株再生菌株的菌落直径较 FO47 大,其中再生菌株 F1-35、F1-38、F1-1

和 F1-41 菌落直径较大,菌株 F1-4 菌落直径较 FO47 小,但较西瓜枯萎菌生长快,说明初筛获得的 15 株再生菌株在自然条件下对防治西瓜枯萎病更具有竞争优势。

表 1 初筛再生菌株的菌落直径
Table 1 Comparison of growth rate of recombinant strains mm

菌株 Strain	时间/h Time						
	24	36	48	60	72	84	96
F1-1	18.67 bcd	27.33 abcd	32.67 bcd	41.67 abc	51.33 a	56.33 a	62.33 a
F1-3	18.00 cd	26.67 de	32.00 bcd	40.00 cd	49.33 abc	54.67 abc	61.67 a
F1-4	17.67 cd	22.67 e	27.00 e	31.33 e	30.67 e	38.00 d	42.00 d
F1-5	18.00 cd	25.67 de	31.67 cd	39.33 d	48.33 cd	53.33 bc	60.00 abc
F1-6	18.33 cd	25.67 de	32.33 bcd	39.33 d	48.33 cd	54.67 abc	60.00 abc
F1-7	18.67 bcd	26.33 bcde	31.33 d	39.30 d	48.33 cd	54.33 abc	59.33 abc
F1-22	18.00 cd	26.50 abcde	32.25 bcd	41.00 bcd	50.25 ab	55.25 ab	61.75 a
F1-26	18.00 cd	26.00 cde	31.67 cd	39.67 cd	48.37 cd	55.00 abc	60.75 ab
F1-35	20.33 a	28.33 a	35.00 a	43.00 a	53.00 a	57.33 a	63.67 a
F1-36	17.67 cd	25.67 de	31.67 cd	39.33 d	48.67 cd	54.00 abc	58.00 bc
F1-38	19.00 abc	28.33 a	34.33 ab	42.33 ab	51.67 a	56.73 a	62.67 a
F1-39	17.67 cd	25.67 de	32.00 bcd	39.67 cd	47.00 bcd	53.67 abc	60.67 ab
F1-40	18.67 bcd	27.33 abcd	32.67 bcd	40.67 bcd	48.67 cd	54.00 abc	61.33 a
F1-41	20.00 ab	28.00 ab	33.33 abc	42.33 ab	49.67 abc	55.00 abc	62.00 a
F1-44	19.00 abc	27.67 abc	33.67 ab	42.00 ab	49.33 abc	54.67 abc	61.67 a
FO47	17.50 cd	26.67 de	31.67 cd	39.33 d	47.00 d	52.33 c	57.33 ab
西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	17.00 d	21.00 e	25.67 e	30.33 e	30.33 e	36.67 d	40.33 d

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note:The data followed by small letters with in a column indicated extremely significant difference ($P<0.05$). The same table.

2.2 再生菌株对西瓜苗期生长发育的影响

将筛选出的菌落直径生长较快的 8 株再生菌株用于西瓜苗期生长发育和枯萎病防效试验。由表 2 可知,除菌株 F1-4 外,其他菌株处理西瓜苗期的生长状况均好于 FO47 和对照处理,各指标的增幅明显大于 FO47,幼苗生长健壮,根系发达,说明这些菌

株对西瓜苗期生长有一定促进作用,其中以菌株 F1-35、F1-38、F1-1 和 F1-41 最为明显,F1-35 处理西瓜幼苗单株鲜质量较 FO47 提高了 36.93%,根长较 FO47 增加了 19.07%,有利于增强植株的抗逆性。

表 2 再生菌株对西瓜苗期生长发育的影响
Table 2 Effect of recombinants on the growth of watermelon plant

菌株 Strain	蔓长 Vine length		根长 Root length		单株鲜质量 Fresh weight	
	平均值/cm	增幅/% Increase amplitude	平均值/cm	增幅/% Increase amplitude	平均值/g	增幅/% Increase amplitude
F1-1	82.26 bc	46.89	20.72 bc	46.33	43.61 bc	46.39
F1-3	80.65 c	44.02	20.32 cd	43.50	42.02 d	41.05
F1-4	57.61 e	2.85	15.82 f	7.89	31.41 f	5.44
F1-22	80.66 c	44.04	20.37 cd	43.86	42.90 cd	44.00
F1-35	88.13 a	57.43	22.42 a	58.33	47.20 a	58.44
F1-38	83.73 b	49.52	21.09 b	49.94	44.40 b	47.70
F1-41	82.06 bc	46.54	20.65 bc	45.83	43.49 bc	45.99
F1-44	80.61 c	43.94	20.06 d	41.67	42.77 cd	43.57
FO47	61.08 d	9.07	18.83 e	32.98	34.47 e	15.71
CK	56.00 e	—	14.16 g	—	29.79 g	—

2.3 再生菌株对西瓜苗期枯萎病的防治效果

由表 3 可知,初筛的再生菌株对西瓜苗期枯萎病均有一定的防治效果,菌株 F1-35、F1-38 和 F1-4 对西瓜枯萎菌的防治效果超过 50%,其中以菌株

F1-35 的防治效果最好,达到 59.04%。虽然菌株 F1-4 的生长速率和促生作用不明显,但其对西瓜枯萎病的防效较好,达到 50.60%。

表 3 再生菌株对西瓜苗期枯萎病的防治效果

Table 3 Control effects of recombinants on *F. oxysporum* f. sp. *niveum*

菌株 Strain	发病率/% Incidence rate	病情指数 Disease index	防治效果/% Control effects	菌株 Strain	发病率/% Incidence rate	病情指数 Disease index	防治效果/% Control effects
F1-1	47.5	28.13	45.78 d	F1-38	45.0	24.38	53.01 b
F1-3	52.5	33.13	36.14 h	F1-41	50.0	30.00	42.17 e
F1-4	45.0	25.63	50.60 c	F1-44	50.0	31.25	39.76 g
F1-22	50.0	30.63	40.96 f	FO47	55.0	33.75	34.94 i
F1-35	40.0	21.25	59.04 a	CK	72.5	51.88	

2.4 再生菌株对多菌灵的抗药性

多菌灵是一种广谱性杀菌剂,常用于防治植物枯萎病,也能抑制生防菌的生长,因此生防菌在具备良好生防作用的同时,也要对一些化学杀菌剂有一定的耐受性。由表 4 可知,多菌灵对亲本 FO47 有较明显的抑制作用,其抗药性临界值为 5 μg/mL。将再生菌株和亲本 FO47 的抗药性进行比较,以期得到可以与多菌灵协同作用防治植物枯萎菌的生防菌株,这样不仅减少了杀菌剂的使用量,还刺激了生防菌的定殖能力,使病菌对生防菌的作用更敏感,以提高生防菌的防效。由表 5 可知,5 μg/mL 的多菌灵能够抑制大部分再生菌株生长,只有菌株 F1-4 表

现出了抗药性,可以和低质量浓度多菌灵混合使用。

表 4 FO47 对多菌灵抗药性临界值的确定

Table 4 The resistance of FO47 to carbendazim

多菌灵/(μg·mL ⁻¹) Concentration of carbendazim	FO47 生长情况 The growth of FO47
1	+
2	+
3	+
4	+
5	—
50	—
100	—

注:“—”表示不生长;“+”表示生长。表 5 同。

Note:“—” indicates no growth;“+” indicates growth. Table 5 same.

表 5 再生菌株和 FO47 抗药性的筛选

Table 5 Comparison of the growth of strain FO47 and recombinants at the concentration

菌株 Strain	生长情况 Growth	菌株 Strain	生长情况 Growth	菌株 Strain	生长情况 Growth	菌株 Strain	生长情况 Growth
F1-1	—	F1-7	—	F1-38	—	F1-44	—
F1-3	—	F1-22	—	F1-39	—	FO47	—
F1-4	+	F1-26	—	F1-40	—	西瓜枯萎病菌	—
F1-5	—	F1-35	—	F1-41	—	<i>F. oxysporum</i>	
F1-6	—	F1-36	—			f. sp. <i>niveum</i>	

3 结论与讨论

本研究利用原生质体融合技术,对非致病性尖镰孢 FO47 和生防放线菌 153 进行融合,筛选出 F1-35、F1-38 和 F1-4 3 株对西瓜枯萎病防效较好的菌株,其中菌株 F1-35 和 F1-38 能够促进西瓜苗期生长,菌株 F1-4 较 FO47 和西瓜枯萎病菌的抗药性高,可以和低质量浓度多菌灵混合使用,协同防治植物病害,降低化学农药的污染,提高防病效果。生防菌的多功能化是生物防治的主流,其不但能有效地防治多种植物病害,也能刺激作物的生长发育,在无致病性情况下提高作物产量,这样的多功能微生物制剂将具有良好的市场前景。

已有研究报道,经真核和原核细胞之间原生质体融合得到了一些性状优良的菌株^[12-15],而且葛岚等^[16]也从 DNA 含量、基因扩增等方面对融合菌株进行了鉴定。本研究选择的非致病性尖镰孢 FO47 为真核生物,生防放线菌 153 为原核生物,属于远缘菌株,其融合后大部分再生菌株是真菌,这可能是 FO47 在融合过程中更占有优势,也可能是在灭活过程中只是对其进行了诱变,如何确定这些菌株是融合菌株还是经过诱变产生的菌株,需要结合分子生物学方法进行进一步鉴定。

[参考文献]

[1] 宗兆锋,乔宏萍,何纪真.2 株重寄生菌的分离和对靶标菌的抑制作用 [J]. 西北农业学报,2002,11(4):1-4.

- Zong Z F, Qiao H P, He Q Z. Isolation of 2 strains of hyperparasite and its inhibiting effects on target pathogens [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2002, 11(4): 1-4. (in Chinese)
- [2] 宗兆锋, 郭小芳, 韩立荣, 等. 诱捕分离土壤中的生防放线菌 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(11): 19-22.
- Zong Z F, Guo X F, Han L R, et al. Traping and isolation of biocontrol actinomycetes from soil [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2004, 32(11): 19-22. (in Chinese)
- [3] 乔宏萍, 宗兆锋. 用重寄生菌防治植物病害 [J]. *中国生物防治*, 2002, 18(4): 176-179.
- Qiao H P, Zong Z F. Biological control of plant pathogens with hyperparasites [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2002, 18(4): 176-179. (in Chinese)
- [4] 韩立荣. 6 株放线菌的基本特性及菌株 153 的防病促生作用研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- Han L R. The basic characteristic of six strains actinomyces and control effect and promote growth of strain 153 [D]. *Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University*, 2006. (in Chinese)
- [5] 郭小芳, 宗兆锋, 杨洪俊. 6 种放线菌抗药性标记及其在植株体内定殖能力测定 [J]. *西北农业学报*, 2005, 14(2): 69-73.
- Guo X F, Zong Z F, Yang H J. Resistance tag of 6 strains of actinomyces and their colonized ability in plants [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2005, 14(2): 69-73. (in Chinese)
- [6] Alabouvette C, Couteaudier Y. Biological control of *Fusarium* wilt with nonpathogenic fusaria [C]//Tjamos E C, Papvizas G C, Cook R J. *Biological control of plant disease*. New York: Plenum Press, 1992: 415-426.
- [7] Fuchs J G, Moenne L Y, Defago G. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain FO47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato [J]. *Plant Disease*, 1997, 81: 492-496.
- [8] Alabouvette C, Lemanceau P, Steinberg C. Recent advances in the biological-control of *Fusarium* wilts [J]. *Pesticide Science*, 1993(37): 365-373.
- [9] 杨 猛, 宗兆锋, 郭小芳, 等. 生防菌 FO47 和 FO47B10 的应用研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(5): 57-60.
- Yang M, Zong Z F, Guo X F, et al. Effect of biocontrol agents FO47 and FO47B10 on watermelon and cucumber [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2005, 33(5): 57-60. (in Chinese)
- [10] 刘 秋. 抗真菌生物农药: 凯地菌素的研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2002.
- Liu Q. Studies on Kaidimycin: A new antifungal agricultural antibiotic [D]. *Shenyang: Shenyang Agricultural University*, 2002. (in Chinese)
- [11] 宗兆锋, 王汝贤, 杨之为, 等. 接种体含量与西瓜枯萎病发生的关系 [J]. *陕西农业科学*, 1996(2): 20-22.
- Zong Z F, Wang R X, Yang Z W, et al. The relationship between inoculum concentration and incidence of watermelon *Fusarium* wilt [J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Science*, 1996(2): 20-22. (in Chinese)
- [12] 吴 伟, 余晓丽, 李咏梅, 等. 诺卡氏菌与假丝酵母的跨界融合及对退化养殖生态的修复 [J]. *水产学报*, 2002, 26(1): 35-41.
- Wu W, Yu X L, Li Y M, et al. Inter-kingdom protoplast fusions between *Nocardia* sp. and *Candida* sp. used to bioremediation for the degeneration fishery ecology [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(1): 35-41. (in Chinese)
- [13] 张彩霞, 于晓丹, 李 颖, 等. 链霉菌菌株 A 与哈茨木霉 T-23 原生质体融合条件的研究 [J]. *生物技术*, 2004, 14(6): 21-23.
- Zhang C X, Yu X D, Li Y, et al. Studies on protoplast fusion between strain of *Streptomyces* A and strain of *Harzianum trichoderma* T-23 [J]. *Biotechnology*, 2004, 14(6): 21-23. (in Chinese)
- [14] 程树培, 邓良伟, 崔益斌. 光合细菌与酵母菌原生质体融合子连续发酵豆制品废水研究 [J]. *环境科学学报*, 1997, 17(3): 372-377.
- Cheng S P, Deng L W, Cui Y B. Continuous fermentation soybean processing waste water with the fusant between photosynthetic bacteria and yeast [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1997, 17(3): 372-377. (in Chinese)
- [15] 王玉水, 邹贵华, 崔益斌, 等. 酿酒酵母与球形红假单胞菌原生质体跨界融合研究 [J]. *生物工程学报*, 1996, 12(增刊): 47-52.
- Wang Y S, Zou G H, Cui Y B, et al. Protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodopseudomonas sphaeroides* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1996, 12(Sup.): 47-52. (in Chinese)
- [16] 葛 岚, 程树培. 跨界原生质体融合产物细胞遗传物质整合过程中 DNA 含量变化 [J]. *南京大学学报: 自然科学*, 1997, 33(3): 81-85.
- Ge L, Cheng S P. DNA content variation of protoplast fusion products during the process of genetic substance integration between inter kingdom cells [J]. *Journal of Nanjing University: Natural Sciences*, 1997, 33(3): 81-85. (in Chinese)