



文章

基于真菌毒素产量的线性回归模型预测枯萎病毒力

邵传歌^{1,2, †}, 向丹丹^{2, †}, 魏宏^{3, †}, 刘思文², 郭莉^{3,4,*}, 李春雨^{2,*}, 吕淑霞^{1,*}, 易干军²

¹沈阳农业大学生物科学与技术学院, 沈阳110866;shaochuang@hotmai.com

²广东省农业科学院果树研究所, 亚热带水果生物学与遗传资源利用重点实验室, 广东省热带亚热带水果研究重点实验室, 广州510640;xiangdandan@gdaas.cn (D.X.);wenwen901203@hotmail.com (S.L.);yiganjun@vip.163.com (G.Y.)

³西安交通大学电子信息工程学院智能网络与网络安全教育部重点实验室, 西安710049;wh513352261@stu.xjtu.edu.cn

⁴西安交通大学生命科学与技术学院, 西安710049

*通讯:guo_li@mail.xjtu.edu.cn (L.G.);lichunyu881@163.com(中一);S.L. 这些作者对这项工作有同等的贡献。

收稿日期:2020年2月11日;接收日期:2020年4月10日;发布时间:2020年4月14日

摘要:枯萎病(*Fusarium oxysporum* f.sp)引起枯萎病。香蕉病(*cubense*, *Foc*)是香蕉最具破坏性的病害之一。对于其风险评估和危害特征, 快速确定*Foc*分离株的毒力至关重要。然而, 使用香蕉植物分析通常需要数周或数月的时间, 这就需要一种更好的方法来加快这一过程并获得可靠的结果。*Foc*产生各种真菌毒素, 如镰刀菌酸(FSA)、beauvericin (BEA)和enniatins (ENs), 以促进其感染。在这项研究中, 我们开发了一个线性回归模型, 利用三种真菌毒素的生产水平来预测*Foc*的毒力。收集了来自20个营养相容性群体(vcg)的40株*Foc*分离株的真菌毒素谱(LC-MS)和植物病害指数(PDI)数据。以FSA、BEA和ENs作为预测变量, PDI值作为响应变量, 从收集的数据中训练线性回归模型。线性检验统计表明, 该模型满足所有线性假设。我们使用所有数据预测PDI, 模型具有较高的适应度(决定系数($R^2 = 0.906$)和调整系数($r^2 = 0.898$)), 表明模型具有较强的预测能力。综上所述, 我们建立了一个线性回归模型, 可以通过*Foc*菌株真菌毒素的定量预测*Foc*对香蕉植株的毒力, 这将有助于快速确定威胁香蕉种植园的新分离的*Foc*枯萎病的毒力。

关键词:枯萎病;号;香蕉枯萎病;霉菌毒素;预测模型

主要贡献:建立了一个线性回归模型, 该模型可用于从*Foc*菌株中真菌毒素的定量预测*Foc*对香蕉植物的毒力。该模型将有助于快速确定新分离的*Foc*在威胁全世界香蕉种植园的香蕉枯萎病流行期间的毒力。

1. 介绍

枯萎病(*Fusarium oxysporum*)是世界上许多重要作物的主要病原菌, 在150多种植物中引起血管性枯萎病[1,2]。其中, 香蕉枯萎病(*Fusarium wilt*)是香蕉最具破坏性的病害, 由Foc (f.s *oxysporum* f.s p.s *cubense*)引起, 目前在所有香蕉种植区流行[3]。全世界成千上万公顷的种植园遭到破坏, 对数十亿美元的产业和数百万农民的稳定构成严重威胁[4-6]。例如, 据报道, 仅在澳大利亚, 枯萎病就给香蕉产业造成了每年超过1.38亿美元的损失[7]。

作为一种典型的土壤传播病原体, *Foc*可以产生孢子作为静止的繁殖体, 一旦它感知到香蕉根的线索, 就可以在土壤中持续很长时间才感染[8,9]。香蕉枯萎病的防治依赖于种植抗性香蕉品种、生物防治剂和作物轮作等综合策略[8,10,11]。目前还没有杀菌剂能够在植物感染后有效控制病害[12]。缺乏有效的抗性植物品种, 又缺乏高活性的杀菌剂, 使得病害防治极具挑战性。因此, 快速可靠地确定病原体的毒力和疾病严重程度对于区分高毒力分离物与轻度或无毒分离物尤为重要, 这对于告知种植者进行疾病管理至关重要。由于迫切需要实时或提前了解疾病情况, 人们投入了大量精力开发疾病预测模型[13]。然而, 由于采样偏差、发生数据质量等原因, 至今仍没有能够准确预测香蕉枯萎病发生和/或毒力的模型[14]。

对枯萎病致病性机制的研究已经鉴定和鉴定了几种次生代谢物, 如真菌毒素, 这些代谢物有助于各种植物疾病的进展[15]。枯萎病在感染过程中会产生多种具有生物活性的真菌毒素[15]。真菌毒素是研究最多的植物病原真菌毒力因子之一[16]。在*Foc*中鉴定出Fusaric acid (FSA)、beauvericin (BEA)和enniatins (ENs)在宿主植物感染过程中参与致病性[17-21]。FSA是所有枯萎病种都会产生的一种非宿主特异性毒素, 通过干扰被侵染植物的代谢, 导致防御酶的抑制和宿主植物细胞活力的降低, 直接参与致病活性[22-25]。对于香蕉枯萎病, FSA作为一种植物毒素, 通过扰乱寄主香蕉植株叶片水分平衡和氮代谢, 在加速该疾病的发展中起着关键作用[18,21]。BEA和ENs是结构相关的环六磷酸多肽, 属于enniatin抗生素家族[26,27]。它们由20多种枯萎病生物合成, 具有多种生物特性, 如体外杀虫、抗菌、抗病毒活性[28,29]。BEA和ENs通过诱导抗坏血酸系统失衡、氧化应激[30]和去极化电位[31,32], 在不同作物中被鉴定出植物毒性活性。因此, 这些真菌毒素中的每一种都与真菌毒力呈正相关。疾病严重程度通常与真菌毒素水平呈正相关。真菌毒素与真菌生长同时产生, 其产生速度与其生长速度成正比, 这一观点已被广泛接受。一些研究已经报道了真菌毒素在冬季的建模方法, 以预测不同作物的真菌生长。例如, 脱氧雪腐镰刀菌醇、玉米赤霉烯酮或黄曲霉毒素等真菌毒素被用于预测冬小麦的枯萎病[33]和黑胡椒的黄曲霉和曲霉寄生[34]。综上所述, 这三种真菌毒素的表征和定量可能有助于预测真菌毒力, 这是影响疾病严重程度的主要因素。

在这项研究中, 我们旨在建立一个统计模型, 以可靠地预测*Foc*分离株的毒力, 基于FSA, BEA和en3种真菌毒素的产生。我们首先对40种不同的*Foc*菌株的体外霉菌毒素产生进行了表征和量化。接下来, 我们建立了一个线性回归模型, 使用真菌毒素(FSA、BEA和ENs)产量作为预测变量, 疾病指数为

响应变量。最后，我们通过将训练好的模型应用到新的数据集上，验证了模型的预测性能。

2. 结果与讨论

2.1. 不同vcg *Foc*分离株真菌毒素的定量分析

本研究调查的20株vcg *Foc*菌株中均可检测到BEA、FSA和ENs三种真菌毒素的产量(表1)。40株菌株的FSA产量在 $1.30 \pm 0.27 \sim 189.35 \pm 9.76 \mu\text{g/g}$ 之间。40株BEA产率在 $1.38 \pm 0.34 \sim 90.78 \pm 9.22 \mu\text{g/g}$ 之间。40株ENs产量范围为 $0.58 \pm 0.14 \sim 188.45 \pm 28.70 \mu\text{g/g}$ 。*Foc*产生的真菌毒素在致病性过程中起着至关重要的作用，在食品和饲料中出现的频率很高。FSA由镰刀菌属产生，据报道在85%的猪饲料样品中检测到，最高浓度为136 mg/kg[35]。也有报道称，它增加了香蕉叶和假茎对*Foc* TR4入侵的敏感性，并在感染组织中真菌菌丝出现之前的疾病发展早期起作用[36]。对于BEA，谷物和谷类食品中BEA的最大报告浓度分别为6400和844 $\mu\text{g/kg}$ [37]。此外，在从不同寄主分离的*F. avenaceum*群体中，还观察到体外ENs产量的变异性[38]。总的来说，我们的结果与最近发表的其他研究结果一致，证实即使两种真菌毒素的结构相似，ENs污染水平也远高于BEA污染水平[39]。同样，对意大利谷物产品和多谷类食品进行的一项调查显示，检测到的最大污染水平为ENs为1100 mg/kg, BEA为70 mg/kg[40,41]。总而言之，我们在40个分离样本中观察到的这三种真菌毒素的生产范围差异很大。这些结果与文献报道相吻合，也表明来自不同镰刀菌物种的不同菌株产生真菌毒素的能力差异很大[42]。据报道，在50和200 mM浓度的BEA处理48 h后，香蕉原生质体的活力下降到20%以下，FSA和BEA处理的香蕉假茎在体外呈浓度依赖性侵蚀[19]。此外，我们研究中检测的BEA、FSA和ENs同时发生的情况与其他报告不同真菌毒素共同污染的研究结果一致[42-44]。例如，从感染增殖性镰刀菌的水稻植株中分离并定量了代谢物FSA、BEA、伏马菌素(FB1)和念珠菌素(MON)，发现在这四种真菌代谢物中，MON和FSA的产生与bakanae病症状发展呈正相关[44]。因此，*Foc*的致病性可能不归因于单一真菌毒素，而可能是几种真菌毒素协同作用的结果。真菌毒素在真菌病原体的毒力、发育和整体生活方式中起着重要作用。对真菌毒素生物学进行更深入的研究将带来一些实际的好处，如了解植物对真菌疾病的抗性的本质，并且对于可持续控制这一重要的植物病原体群至关重要[45]。

表1。本研究分离的尖孢镰刀菌及其在Pisang香蕉植株上的产毒和致病能力。

Strains ^a	VCGs	Race	Provider	Fusaric acid Concentration ($\mu\text{g/g}$) ^{b, c}	Beauvericin Concentration ($\mu\text{g/g}$) ^{b, c}	Enniatins Concentration ($\mu\text{g/g}$) ^{b, c}	Disease Index
GD-14	0120	STR4	Chunyu Li	164.98 ± 2.23^B	24.51 ± 2.53^F	2.93 ± 0.73^L	3.50
GD-42	0120	STR4	Chunyu Li	17.66 ± 3.66^{MNO}	15.56 ± 3.56^{HJ}	3.41 ± 1.17^{KL}	1.50
GM	0121	TR4	Chunyu Li	189.35 ± 9.76^A	2.58 ± 1.41^{JK}	4.47 ± 1.30^{JKL}	3.00
F9130-2	0121	TR4	Randy C. Ploetz	1.94 ± 0.54^P	2.43 ± 1.11^{JK}	188.45 ± 28.70^A	2.73
CAV443	01210	STR4	Altus Viljoen	78.20 ± 0.46^{HIJ}	45.18 ± 4.34^D	2.37 ± 0.41^L	2.53
CAV632	01210	STR4	Altus Viljoen	135.44 ± 11.03^C	2.35 ± 0.57^{JK}	14.93 ± 4.80^J	2.30

SH3142	01211	STR4	Randy C. Ploetz	23.43 ± 1.28 ^{MN}	17.27 ± 1.89 ^{GH}	41.54 ± 4.21 ^{FG}	2.53
SH3142-3	01211	STR4	Randy C. Ploetz	11.70 ± 1.85 ^{OP}	24.27 ± 1.96 ^F	37.11 ± 2.28 ^G	2.37
STTNZ1	01212	1	Randy C. Ploetz	1.30 ± 0.27 ^P	2.26 ± 0.76 ^{JK}	72.44 ± 14.16 ^D	1.80
STNP2-3	01212	1	Randy C. Ploetz	1.42 ± 0.30 ^P	3.53 ± 0.66 ^{JK}	96.45 ± 6.43 ^B	2.03
GD-06	1213	TR4	Chunyu Li	2.85 ± 1.63 ^P	2.41 ± 1.44 ^{JK}	0.58 ± 0.14 ^L	1.07
FJ-11	1213	TR4	Chunyu Li	4.73 ± 1.85 ^P	3.82 ± 1.25 ^{JK}	3.90 ± 1.24 ^{KL}	1.13
MW2	01214	1	Randy C. Ploetz	118.77 ± 5.78 ^D	1.84 ± 0.26 ^K	2.38 ± 0.37 ^L	2.60
MW40	01214	1	Randy C. Ploetz	86.54 ± 2.15 ^{GH}	2.40 ± 1.44 ^{JK}	4.97 ± 0.75 ^{JKL}	2.30
01215-M	01215	STR4	Chunyu Li	103.44 ± 4.47 ^E	1.38 ± 0.34 ^K	1.14 ± 0.46 ^L	2.13
1215-1	01215	STR4	Chunyu Li	118.66 ± 7.20 ^D	3.40 ± 0.16 ^{JK}	0.91 ± 0.28 ^L	2.17
GD-13	01216	TR4	Chunyu Li	75.13 ± 10.79 ^J	22.11 ± 1.23 ^{FG}	8.36 ± 3.65 ^{JKL}	2.83
FJ-12	01216	TR4	Chunyu Li	95.40 ± 5.40 ^{EF}	66.21 ± 17.06 ^B	20.33 ± 3.02 ^{HI}	3.50
MAL10	01217	1	Randy C. Ploetz	84.82 ± 2.82 ^{GH}	90.78 ± 9.22 ^A	53.67 ± 2.58 ^E	4.53
MAL6	01217	1	Randy C. Ploetz	89.47 ± 3.13 ^{FGH}	87.70 ± 3.54 ^A	71.44 ± 6.64 ^D	4.80
GX-04	01218	1	Randy C. Ploetz	2.14 ± 1.15 ^P	1.55 ± 0.65 ^K	3.67 ± 6.64 ^{KL}	0.47
STSUM3	01218	1	Randy C. Ploetz	9.58 ± 0.80 ^{OP}	2.37 ± 0.22 ^{JK}	0.95 ± 0.40 ^L	1.37
INDO25-1	01219	STR4	Randy C. Ploetz	13.42 ± 2.07 ^{NO}	4.97 ± 0.80 ^{JK}	6.19 ± 0.78 ^{JKL}	1.63
INDO25-2	01219	STR4	Randy C. Ploetz	27.66 ± 0.25 ^M	6.85 ± 0.50 ^{JK}	1.22 ± 0.56 ^L	2.07
PW6	0122	STR4	Randy C. Ploetz	72.80 ± 7.14 ^J	31.15 ± 3.14 ^E	6.12 ± 1.16 ^{JKL}	2.93
PW7	0122	STR4	Randy C. Ploetz	88.98 ± 4.34 ^{FGH}	43.49 ± 2.22 ^D	7.37 ± 1.17 ^{JKL}	2.87
GD-15	01220	1	Chunyu Li	1.68 ± 0.50 ^P	2.47 ± 1.19 ^{JK}	3.58 ± 0.37 ^{KL}	0.43
HN-03	01220	1	Chunyu Li	2.87 ± 0.47 ^P	7.52 ± 1.75 ^{JK}	6.97 ± 0.82 ^{JKL}	1.13
HN-11	0123	1	Chunyu Li	119.99 ± 8.50 ^D	31.88 ± 9.10 ^E	1.35 ± 0.22 ^L	3.43
GX-02	0123	1	Chunyu Li	173.00 ± 26.15 ^B	22.86 ± 1.84 ^{FG}	4.14 ± 1.15 ^{JKL}	3.50
GD-37	0124	1	Chunyu Li	5.63 ± 0.41 ^P	61.44 ± 0.78 ^B	26.70 ± 1.29 ^H	2.37
HN-13	0124	1	Chunyu Li	11.66 ± 1.64 ^{OP}	2.32 ± 0.62 ^{JK}	2.53 ± 0.48 ^L	1.53
CAV941	0125	1	Altus Viljoen	119.55 ± 2.14 ^D	2.84 ± 0.62 ^{JK}	10.50 ± 1.95 ^{JKL}	3.23
CAV125	0125	1	Altus Viljoen	100.28 ± 5.39 ^{EF}	9.59 ± 0.31 ^{JI}	1.22 ± 0.19 ^L	3.00
GD-18	0126	STR4	Chunyu Li	4.29 ± 0.59 ^P	54.43 ± 1.46 ^C	27.48 ± 2.52 ^H	2.03
GD-26	0126	STR4	Chunyu Li	92.61 ± 3.75 ^{EF}	4.20 ± 0.84 ^{JK}	47.87 ± 2.50 ^{EF}	2.43
GX-03	0128	1	Cavendish	90.06 ± 13.47 ^{FG}	4.69 ± 0.24 ^{JK}	4.59 ± 1.26 ^{JKL}	2.33
CAV 567	0128	1	Altus Viljoen	4.56 ± 0.48 ^P	1.67 ± 0.43 ^K	67.18 ± 2.89 ^D	1.97
CAV186	0129	STR4	Altus Viljoen	46.50 ± 1.01 ^L	2.67 ± 1.33 ^{JK}	85.79 ± 3.87 ^C	3.47
CAV 438	0129	STR4	Altus Viljoen	58.17 ± 1.67 ^K	47.67 ± 4.68 ^D	14.34 ± 1.27 ^{JK}	3.03
Control 1 ^d				0	0	0	0
Control 2 ^e				0	0	0	0

^a *Foc*分离株保存在中国农业文化收藏馆(ACCC);*数据以均数±标准误差(mean±SEM)表示;同列不同大写字母后面的平均值经Fisher保护最不显著差异检验有显著性差异($p < 0.05$);d对照¹为灭菌的PDA培养基;e对照²为灭菌去离子水。

2.2. 香蕉Foc毒力预测的线性回归模型

所有三种真菌毒素都具有植物毒性活性, 并且所有测试的分离株都被证明是生产者, 这使我们怀疑它们参与了香蕉植物症状的表达。为此, 测定了Pisang Awak香蕉中相同分离株的植物病害指数(PDI)值

在分离株中对植株和霉菌毒素产量进行定量。如表1所示, 所有测试的*Foc*分离株都能感染香蕉植株, 并引起香蕉枯萎病的典型症状(图1)。数据显示, *Foc*分离株之间的疾病严重程度和霉菌毒素水平存在较大差异。Xu认为真菌毒素与FHB病原菌*F. graminearum*的数量之间存在显著的关系[46]。分离株MAL6、MAL10和FJ-12毒力最强, 其PDI值分别为4.80、4.53和3.50。分离株GD-15、GX-04和GD-06对卡文迪什香蕉的毒力最低, PDI值分别为0.43、0.47和1.07。发现PDI值与真菌毒素含量之间存在良好的相关性, 即当一株植物受到严重感染时, 它也受到严重的真菌毒素污染。因此, 体外检测是预测田间和温室条件下可能存在的霉菌毒素污染的有用工具[47]。反过来呢? 是否可以用*Foc*分离物的霉菌毒素产生水平来预测病原体的毒力? 基于*Foc*分离株的霉菌毒素和疾病指数(PDI)测量, 用R编程语言建立了预测疾病毒力的线性模型[48](表1)。在该模型中, 以实验室控制条件下反映真菌毒力的PDI值作为响应变量, 以FSA、BEA和ENs三种真菌毒素作为预测变量(图2)。进行图形残差分析, 发现PDI与FSA之间的分布, 而不是BEA和ENs, 更接近于对数分布而不是线性分布(补充图S1)。因此, 为了改善校准曲线的拟合, 在该模型中采用了FSA变量的对数转换(图2B)。对数变换会减小校准范围内最低点和最高点之间的距离, 从而得到一条更压缩的回归线[49]。



图1所示。 *Foc*分离株不同致病性的分类。(A)高毒力: MAL10; (B)中度毒力: GM; (C)弱毒力: GD-42; (D)控制。

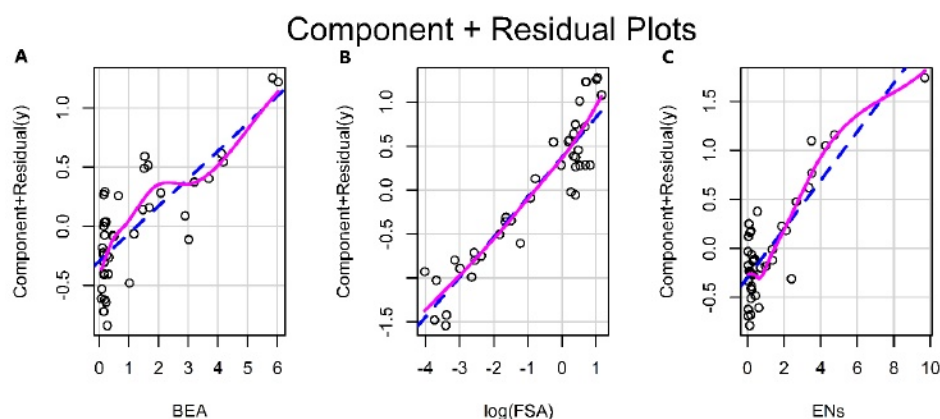


图2。每个自变量的分量加残差图表示三个变量。(A) BEA, (B) log变换FSA, (C) ENs。

在建立模型时，我们除了考虑霉菌毒素的浓度外，还考虑了其毒性的重要性，因为在体外或植物中不一定大量产生高毒性化合物的情况并不罕见。因此，为了生成稳健的校准模型，在模型中考虑香蕉细胞悬浮液EC50 (FSA为60μM, BEA为15μM, ENs为20μM)，使用EC50: log (CFSA/EC50FSA), CBEA/EC50BEA和CENs/EC50ENs调整每个变量。线性模型得到的结果方程如下：

$$PDI = 0.23260 \times \frac{C_{BEA}}{EC50_{BEA}} + 0.45392 \times \log\left(\frac{C_{FSA}}{EC50_{FSA}}\right) + 0.24794 \times \frac{C_{ENs}}{EC50_{ENs}} + 2.19782 \quad (1)$$

EC50值表明3种真菌毒素对香蕉原生质体均有毒性。这与以往报道BEA对香蕉植株假茎造成白色干枯，对香蕉植株上部组织造成黑色侵蚀一致，同时BEA的毒性明显大于FSA[19]。这也证实了真菌代谢物在疾病发展中具有至关重要的作用[18,19,21]。此外，香蕉中的*Foc*可同时产生真菌毒素，它们在致病过程中的加性和协同作用有待进一步研究。

2.3. PDI预测中的模型性能评价

在统计模型中，线性回归模型以其合理的精度和相对简单的实现方式显示出良好的效果[50]。稳健的回归模型是在整个校准范围内进行准确和可重复量化的基础[49]。决定系数(R²)是将线性模型拟合到给定观测数据集的质量的最重要评价标准之一。三个变量均具有较高的系数(R² = 0.9029)和调整系数(R²_{adj} = 0.8948)，表明该模型解释了超过89.48%的观测值变异性。*t*统计量的*p*值为2.2e-16，表明线性关系在统计上显著，模型对数据的拟合明显优于平均值。此外，使用gvlma工具(R中的软件包)对线性模型假设进行了全局检验，以验证线性模型所需的所有统计约束，包括对残差分布的偏度和峰度、链接函数(线性模型统计显著)和异方差(残差的方差依赖于自变量)的假设[51]。全局检验(gvlma)的结果证实，线性模型假设均满足*p*值高于> 0.05的要求(表2)。

表2. 线性模型假设检验总结。

Test	Value	p-value	Decision
Global Stat	1.3483097	0.8531	Assumptions met
Skewness	0.0004423	0.9832	Assumptions met
Kurtosis	0.6439081	0.4223	Assumptions met
Link Function	0.5084728	0.4758	Assumptions met
Heteroscedasticity	0.1954865	0.6584	Assumptions met

分位数-分位数(Q-Q)图也用于评估残差的正态假设，通过将观测到的残差分布与理论残差分布进行对比[52,53]。如图3A所示，误差项通常可以被认为是正态分布，而绝对学生化残差图(图3B)显示，除了一个点外，初始数据集中预测数据和观测数据之间的差异在-2-2范围内，这表明所有数据都遵循正态分布。

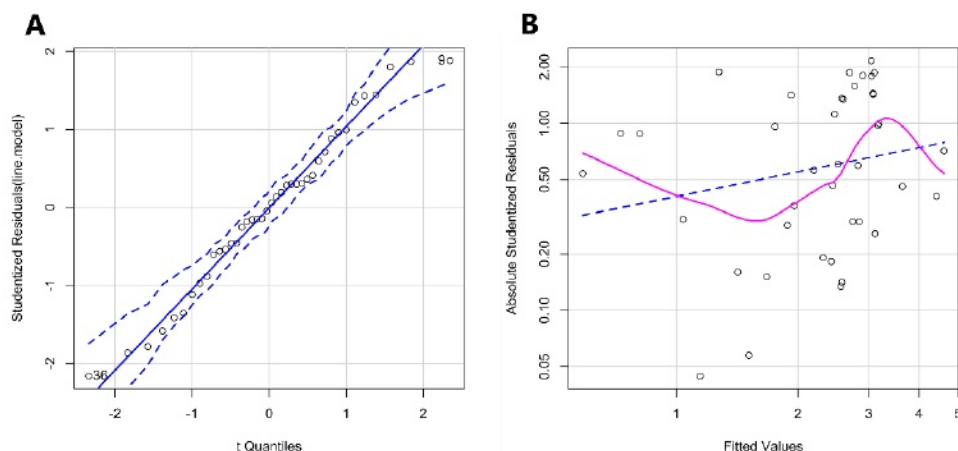


图3. (A)所有数据的Q-Q图。(B)数据集的绝对学生残差(Absolute Studentized Residuals)。所有的数据都在-2.2的范围内, 除了一个点。这两个图说明了这个数据集服从正态分布。

最后, 为了评估该线性模型在预测中的性能, 使用Pisang Awak cv '广粉#1' (ABB)香蕉幼苗致病性试验收集的新数据集来预测PDI, 该数据集包括患病植株中的霉菌毒素含量和PDI值。如表3所示, 预测和观测的PDI之间的差异在-0.3-0.6的范围内, 证明我们的模型表现良好。

表3. 附加数据集用作线性模型预测PDI的输入。

Strains	FSA Concentration ($\mu\text{g/g}$) ^a	BEA Concentration ($\mu\text{g/g}$) ^a	ENs Concentration ($\mu\text{g/g}$) ^a	Disease Index	Predicted Disease Index
GD30	4.65 \pm 0.38	3.83 \pm 0.19	2.22 \pm 0.30	0.57	1.13
GD19	56.12 \pm 4.33	4.46 \pm 1.22	1.46 \pm 0.45	2.03	2.26
GD20	5.49 \pm 0.92	1.75 \pm 0.55	2.16 \pm 0.38	0.73	1.05
GD05	3.55 \pm 0.53	2.62 \pm 0.12	2.27 \pm 0.26	0.60	0.94
GX01	100.57 \pm 1.80	17.68 \pm 1.98	2.59 \pm 0.56	3.00	2.72
HN04	11.72 \pm 1.71	6.48 \pm 0.56	1.63 \pm 0.45	1.57	1.62
FJ10	13.39 \pm 1.29	4.64 \pm 0.46	4.49 \pm 0.55	1.20	1.60
YN6	9.14 \pm 0.67	4.72 \pm 0.58	2.37 \pm 0.27	1.37	1.43
Control ^b	0	0	0	0	0

^a数据表示为均值 \pm 标准误差(mean \pm SEM);^b本实验的对照为健康的Pisang Awak cv '广粉#1' (ABB)香蕉幼苗, 经消毒去离子水处理。

当然, 该模型也存在抽样偏差和数据质量导致的不确定性。由于用于拟合模型的数据点的大小有限, 因此获得的结果是上下文相关的。植物病害结果取决于各种因素, 如病原体毒力、宿主抗性、环境因素(包括温度、湿度和微生物组)。鉴于植物病害发展具有如此复杂的性质, 在田间条件下准确预测病害发生和严重程度极具挑战性。我们的工作并不试图预测田间的植物病害流行, 这需要更复杂的许多变量模型, 可能是非线性或非参数性质。相反, 我们专注于开发一个简单而强大的模型, 可以快速确定香蕉枯萎病的致病因子*Foc*的真菌毒力, 以促进风险评估和帮助实施疾病控制策略。利用真菌毒素产量与疾病指数的正相关关系, 利用40株*Foc*菌株的霉菌毒素和疾病指数测量数据训练线性回归模型。将该模型应用于测试数据, 证明了该模型的预测能力。

诚然，该模型很简单，只考虑了三个变量，并且可能可以通过纳入更多的变量(如真菌效应器，更多的真菌毒素等)来改进。然而，这将需要额外的输入，如更多毒素的定量或更多基因座菌株的基因分型，这一过程可能会导致模型过拟合或减慢预测结果的报告速度。因此，目前的模型可以在短时间内(几周内)可靠地预测*Foc*的毒力。通过对基因或遗传途径的实验分析，对真菌毒力有了更好的了解，可以想象，该模型可以进一步改进，使用因子，这样它要么需要更少的数据收集时间，要么给出更高的预测精度。

3. 结论

在本研究中，利用真菌毒素水平建立了一个预测真菌毒力的模型，该模型可作为评估从环境中新分离的*Foc*菌株风险的工具。香蕉枯萎病的流行通常与*Foc*接种量及其产生*Foc*真菌毒素的能力密切相关。本文报道的结果扩展了我们对*Foc*感染和霉菌毒素产生的合适指标的认识。目前的模型非常简单和原始，只考虑了已知对*Foc*毒力有贡献的三种真菌毒素的生产能力。尽管如此，本研究提供了可能对未来风险分析有用的初步信息。随着未来发现更多的真菌毒素或效应物对真菌毒力的贡献，该模型可以通过纳入更多代表这些毒力因素的变量来改进。然而，我们认为现在迫切需要一种预测模型来帮助区分高毒力的*Foc*菌株与轻度或无毒的菌株，以便评估新出现的*Foc*菌株的风险，并及时采取措施进行疾病控制。

4. 材料与方法

4.1. 化学试剂

纯度 $\geq 97\%$ 的分析标准品FSA、BEA和ENs购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。乙腈(ACN)、甲醇(MeOH)、甲醇酸和其他有机溶剂(色谱级)由Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)提供。在甲醇中制备这些霉菌毒素的原液(1mg/mL)，并保持在 -20°C 。实验中霉菌毒素的最终浓度通过在培养基中稀释得到，培养基中甲醇的最终浓度为0.5% (v/v)。水被Millipore milliq系统(Millipore, Bedford, MA, USA)连续纯化，电导率 $< 18.2 \text{ MW} \cdot \text{cm}$, 25°C 。

4.2. 真菌菌株和植物材料

本研究中用于生产霉菌毒素的*Foc*单孢子菌分离株(vcg0120 - 01220)均维持在广东环凯微生物科学研究所PDA(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)中。中国农业文化收集中心(ACCC)用15%的glycerol在 -80°C 下对香蕉八喜(Musa AAA Cavendish)和广粉1号(Musa ABB Pisang Awak)进行致病性试验(表1)。将真菌菌株常规接种于90 mm板的中心， 28°C 孵育7天。这些新鲜培养物用于制备接种物，用于霉菌毒素产生分析。试验用5-6叶的香蕉品种(八喜(Musa AAA Cavendish)和广粉1号(Musa ABB PisangAwak))由广东农业科学院果树研究所香蕉组织培养中心提供。

4.3. *Foc*产真菌毒素的体外提取

*Foc*分离株接种于PDA板上， 28°C 暗室培养。15天后，收获菌丝，超声处理，甲醇提取代谢物。的

提取液采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-ESI-MS)进行分析;立法会deca xp plus;Thermo Finnigan, Thermo Corp, Rockford, IL, USA)。补充材料中提供了化学萃取、仪器条件和质量保证/质量控制(QA/QC)的详细方案。作为标准的霉菌毒素包括FSA、BEA、ENs。

4.4. 《真菌毒素对香蕉的毒性》

本研究利用香蕉原生质体测定了*Foc*真菌毒素对香蕉的毒性作用。本研究使用的香蕉原生质是从‘东莞大蕉’(ABB)品种的胚性细胞悬液(ECS)中获得的,如前所述(表S1)[19, 54]。补充材料中提供了ECS启动和维护的简要协议。以 1.2×10^7 个原生质体/mL细胞体积(PCV)的产量从ECS中分离出有活力的原生质体,悬浮在20 mL的预质解缓冲液中(25 mM Tris-Mes, 0.6 M山梨醇, 0.5% BSA和0.5% CaCl₂, pH 7.4),并暴露于不同浓度的FSA、BEA和ENs(0、2、10、20、50、100和200 μ M, $n = 3$)。根据制造商的建议(Biotium, Hayward, CA, USA),使用Alamar Blue试验,在培养3天后对三种真菌毒素对香蕉原生质体的毒性效应进行了研究。简单地说,在96孔板(Costar, Cambridge, MA, USA)上进行反应,每孔含有 2×10^4 个细胞(在200 μ L培养基中),加入20 μ L Alamar Blue (10% v/v),在37°C的培养箱中再孵育4 h。然后用Spectra Max i3平板阅读器(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)测量荧光(激发530 nm, 发射590nm)。每次实验至少分析3个重复的孔。

4.5. 致病性测定

为了研究真菌毒素生物合成与致病性的关系,随机选取8株vcg(表1),在无菌的种植介质(6份蛭石、2份泥炭、1份椰椰)中,对5~6叶期的Pisang Awak cv 'Guangfen #1'(ABB)香蕉植株进行毒力试验,研究其致病性。用8种vcg菌的孢子悬浮液接种植株,接种浓度为10-5个分生孢子/g的无菌种植培养基,将接种植株置于温度25-28°C、湿度40%的温室中,土壤湿度保持在60%左右。接种30 d后对香蕉植株的枯萎病毒力进行观察,采用1-5分制的病害指数进行评分[55]。百分比病害指数(PDI)计算公式为:病害指数= \sum (额定株数 \times number/总株数)。同时,不进行*Foc*处理的一组作为对照组。在完全随机区组设计中重复处理三次,每次重复由10个植株(20 g)组成。收集植物组织,用搅拌器(Ultra-Turrax T18, IKA, 德国)均质3分钟,并按照第4.3部分描述的方法进行霉菌毒素提取。

4.6. 香蕉枯萎病预测模型的建立与验证

使用R包[48]、gvlma[51]和car[56]建立了*Foc*致病性风险的预测线性模型。选取40株*Foc*菌株中检测到的3种真菌毒素(FSA、BEA和ENs)含量和致病性测定得到的PDI值进行模型建立(表1)。每种真菌毒素与PDI值之间进行线性检验,以保证模型的准确性。由于EC50是评价毒力的重要指标,因此在线性模型中以各霉菌毒素浓度与其EC50之比作为预测变量,同时以PDI值作为响应变量。对每种霉菌毒素进行了图形残差分析,并对FSA变量进行了对数变换,因为FSA和PDI之间的分布更接近对数而不是线性

分布。建立香蕉枯萎病PDI预测模型的一般方程为:

$$y = a + b \times \log(C_{FSA}/EC50_{FSA}) + d \times C_{BEA}/EC50_{BEA} + e \times C_{ENS}/EC50_{ENS} \quad (2)$$

其中a、b、d、e为待估算参数, C_{FSA} 、 C_{BEA} 、 C_{ENS} 分别代表FSA、BEA、ENs的浓度, $EC50_{FSA}$ 、 $EC50_{BEA}$ 、 $EC50_{ENS}$ 分别代表FSA、BEA、ENs的植物毒性。

4.7. Statistical Analysis and Data Processing

所有数据的统计分析均在统计程序包SPSS 20.0 (SPSS软件, 芝加哥, 伊利诺伊州, 美国)中进行。分别使用Kolmogorov-Smirnov检验和Levene's检验初步验证数据的正态性和方差的齐性。所有数据以均数±均数标准误差(SEM)报告。对照和各暴露组之间的差异通过单向方差分析(ANOVA)和Tukey检验进行评估。如果ANOVA显示治疗的显著效果, 则对数据进行Tukey事后检验, 以检验统计学显著性($p < 0.05$)。

补充资料:以下资料可在www.mdpi.com/2072-6651/12/4/254/s1网上查阅, 表S1: M1和M2培养基的成分表, 图S1:各自变量的成分加残差图。紫色和蓝色虚线越拟合, 线性越强。而如果一个图是非线性的, 则意味着预测器的功能建模不足, 可能会做一些变换。

作者贡献:概念化, c.s.和C.L.;方法学, C.S.和D.X.;软件, H.W.;验证, l.g.和S.L.;形式分析, c.s., D.X., H.W.;调查, l.g., h.w., S.L.;资源, l.g.和C.L.;数据管理, D.X.;写作—初稿准备, D.X.;写作—审查和编辑, C.L.和L.G.;监管, C.L.和S.L.;项目管理, G.Y.;所有作者已阅读并同意稿件的出版版本。

基金资助:国家重点研发计划项目(2018YFD1000307)、广东省重点领域研发项目(2019B020216001)、广东省农业科学院院长基金项目(202007)、广东省现代农业产业技术创新团队专项基金和农业部948项目(2011-G16)资助。果树研究所所长基金(201906), 国家自然科学基金(31701739)。

利益冲突:作者声明无利益冲突。

参考文献

1. Natalia, K.; Ma Gorzata, R.O.; Stanis, A.B. Diversity of laccase-coding genes in *Fusarium oxysporum* genomes. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 933.
2. Zheng, Z.; Zhang, Y.; Wu, X.; Yang, H.; Ma, L.; Zhou, M. FoMyo5 motor domain substitutions (Val 151 to Ala and Ser 418 to Thr) cause natural resistance to fungicide phenamacril in *Fusarium oxysporum*. *Pestic. Biochem. Phys.* **2018**, *147*, 119–126.
3. Butler, D. Fungus threatens top banana. *Nature* **2013**, *04*, 195.
4. Li, B.; Du, J.; Lan, C.; Liu, P.; Weng, Q.; Chen, Q. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *Eur. J. Plant Pathol.* **2013**, *135*, 903–911.
5. Ghag, S.B.; Shekhawat, U.K.S.; Ganapathi, T.R. Fusarium wilt of banana: Biology, epidemiology and management. *PANS Pest Artic. News Summ.* **2015**, *61*, 250–263.
6. Ploetz, R.C. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Prot.* **2015**, *73*, 7–15.
7. Cook, D.C.; Taylor, A.S.; Meldrum, R.A.; Drenth, A. Potential economic impact of Panama disease (tropical race 4) on the Australian banana industry. *J. Plant Dis. Prot.* **2015**, *122*, 229–237.
8. Momma, N.; Momma, M.; Kobara, Y. Biological soil disinfestation using ethanol: Effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms. *J. Gen. Plant Pathol.* **2010**, *76*, 336–344.

9. Guo, L.; Han, L.; Yang, L.; Zeng, H.; Fan, D.; Zhu, Y.; Feng, Y.; Wang, G.; Peng, C.; Jiang, X.; et al. Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e117621.
10. Alabouvette, C.; Olivain, C.; Migheli, Q.; Steinberg, C. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* **2009**, *184*, 529–544.
11. Wen, T.; Huang, X.; Zhang, J.; Zhu, T.; Meng, L.; Cai, Z. Effects of water regime, crop residues, and application rates on control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *J. Env. Sci.* **2015**, *1*, 30–37.
12. Dita, M.; Barquero, M.; Heck, D.; Mizubuti, E.S.G.; Staver, C.P. Fusarium Wilt of Banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1468.
13. Juroszek, P.; Von Tiedemann, A. Linking plant disease models to climate change scenarios to project future risks of crop diseases: A review. *J. Plant Dis. Prot.* **2015**, *122*, 3–15.
14. Salvacion, A.R.; Solpot, T.C.; Cumagun, C.J.R.; Pangga, I.B.; Magcale-Macandog, D.B.; Cruz, P.C.S.; Saludes, R.B.; Aguilar, E.A. Exploring environmental determinants of Fusarium wilt occurrence on banana in South Central Mindanao, Philippines. *Hell. Plant Prot. J.* **2019**, *12*, 78–90.
15. Desjardins, A.E.; Proctor, R.H. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 47–50.
16. Portal, N.; Soler, A.; Alphonsine, P.A.M.; Borrás-Hidalgo, O.; Portieles, R.; Peña-Rodríguez, L.M.; Yanes, E.; Herrera, L.; Solano, J.; Ribadeneira, C.; et al. Nonspecific toxins as components of a host-specific culture filtrate from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. *Plant Pathol.* **2018**, *67*, 467–476.
17. Jestoi, M. Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—a review. *Crit. Rev. Food Sci.* **2008**, *48*, 21–49.
18. Dong, X.; Ling, N.; Wang, M.; Shen, Q.; Guo, S. Fusaric acid is a crucial factor in the disturbance of leaf water imbalance in *Fusarium*-infected banana plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2012**, *60*, 171–179.
19. Li, C.; Zuo, C.; Deng, G.; Kuang, R.; Yang, Q.; Hu, C.; Sheng, O.; Zhang, S.; Ma, L.; Wei, Y.; et al. Contamination of bananas with beauvericin and fusaric acid produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70226.
20. Ding, Z.; Li, M.; Sun, F.; Xi, P.; Sun, L.; Zhang, L.; Jiang, Z. Mitogen-activated protein kinases are associated with the regulation of physiological traits and virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e122634.
21. Ding, Z.; Yang, L.; Wang, G.; Guo, L.; Liu, L.; Wang, J.; Huang, J. Fusaric acid is a virulence factor of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on banana plantlets. *Trop Plant Pathol.* **2018**, *43*, 297–305.
22. Bouizgarne, B.; El-Maarouf-Bouteau, H.; Frankart, C.; Rebutier, D.; Madiona, K.; Pennarun, A.M.; Monestiez, M.; Trouverie, J.; Amiar, Z.; Briand, J.; et al. Early physiological responses of arabidopsis thaliana cells to fusaric acid: Toxic and signalling effects. *New Phytol.* **2006**, *169*, 209–218.
23. Marrè, M.T.; Vergani, P.; Albergoni, F.G. Relationship between fusaric acid uptake and its binding to cell structures by leaves of *egeria densa* and its toxic effects on membrane permeability and respiration. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1993**, *42*, 141–157.
24. Kuzniak, E. Effects of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures. *J. Phytopathol.* **2001**, *149*, 575–582.
25. D'Alton, A.; Etherton, B. Effects of fusaric acid on tomato root hair membrane potentials and ATP levels. *Plant Physiol.* **1984**, *74*, 39–42.
26. Fraeyman, S.; Meyer, E.; Devreese, M.; Antonissen, G.; Demeyere, K.; Haesebrouck, F.; Croubels, S. Comparative *in vitro* cytotoxicity of the emerging *Fusarium* mycotoxins beauvericin and enniatins to porcine intestinal epithelial cells. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *121*, 566–572.
27. Han, X.; Xu, W.; Zhang, J.; Xu, J.; Li, F. Natural occurrence of beauvericin and enniatins in corn- and wheat-based samples harvested in 2017 collected from Shandong Province, China. *Toxins* **2019**, *11*, 9.
28. Sy-Cordero, A.A.; Pearce, C.J.; Oberlies, N.H. Revisiting the enniatins: A review of their isolation, biosynthesis, structure determination and biological activities. *J. Antibiot.* **2012**, *65*, 541–549.
29. Liuzzi, V.C.; Mirabelli, V.; Cimmarusti, M.T.; Haidukowski, M.; Leslie, J.F.; Logrieco, A.F.; Caliandro, R.; Fanelli, F.; Mulè, G. Enniatin and beauvericin biosynthesis in *Fusarium* species: Production profiles and structural determinant prediction. *Toxins* **2017**, *9*, 45.

30. Paciolla, C.; Dipierro, S.; Dipierro, N.; Mulè, G.; Logrieco, A. The mycotoxins beauvericin and T-2 induce cell death and alteration to the ascorbate metabolism in tomato protoplasts. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2004**, *65*, 49–56.
31. Pavlovkin, J.; Mistríková, I.; Jařková, K.; Tamás, L. Impact of beauvericin on membrane properties of young initial leaves of maize with different susceptibility to *Fusarium*. *Plant Soil Environ.* **2012**, *58*, 205–210.
32. Pavlovkin, J.; Mistríková, I.; Luxová, M.; Mistrík, I. Effects of beauvericin on root cell transmembrane electric potential, electrolyte leakage and respiration of maize roots with different susceptibility to *Fusarium*. *Plant Soil Environ.* **2011**, *52*, 492–498.
33. Pitt, R.E. A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental conditions. *J. Food Prot.* **1993**, *56*, 139–146.
34. Garcia, D.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.; Marín, S. Modeling kinetics of aflatoxin production by *aspergillus flavus* in maize-based medium and maize grain. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *162*, 182–189.
35. Smith, T.K.; Sousadias, M.G. Fusaric acid content of swine feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2296–2298.
36. Liu, S.; Li, J.; Zhang, Y.; Liu, N.; Viljoen, A.; Mostert, D.; Zuo, C.; Hu, C.; Bi, F.; Gao, H.; et al. Fusaric acid instigates the invasion of banana by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4. *New Phytol.* **2020**, *225*, 913–929.
37. Streit, E.; Schwab, C.; Sulyok, M.; Naehrer, K.; Schatzmayr, G. Multi-Mycotoxin Screening Reveals the Occurrence of 139 Different Secondary Metabolites in Feed and Feed Ingredients. *Toxins* **2013**, *5*, 504–523.
38. Stępień, Ł.; Wańkiewicz, A. Sequence Divergence of the Enniatin Synthase Gene in Relation to Production of Beauvericin and Enniatins in *Fusarium* Species. *Toxins* **2013**, *5*, 537–555.
39. Covarelli, L.; Beccari, G.; Prodi, A.; Generotti, S.; Etruschi, F.; Meca, G.; Juan, C.; Mañes, J. Biosynthesis of beauvericin and enniatins *in vitro* by wheat *Fusarium* species and natural grain contamination in an area of central Italy. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 618–626.
40. Juan, C.; Mañes, J.; Raiola, A.; Ritieni, A. Evaluation of beauvericin and enniatins in Italian cereal products and multicereal food by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chem.* **2013**, *140*, 755–762.
41. Juan, C.; Raiola, A.; Mañes, J.; Ritieni, A. Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. *Food Control* **2014**, *39*, 227–236.
42. Fotso, J.; Leslie, J.F.; Smith, J.S. Production of Beauvericin, Moniliformin, Fusaproliferin, and Fumonisin B1, B2, and B3 by Fifteen Ex-Type Strains of *Fusarium* Species. *Appl. Environ. Microb.* **2002**, *68*, 5195–5197.
43. Gruber-Dorninger, C.; Novak, B.; Nagl, V.; Berthiller, F. Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *65*, 7052–7070.
44. Quazi, S.A.J.; Sariah, M.; Ahmad, Z.A.B.; Hawa, J. Detection of fungal metabolites from bakanae diseased plants and their relationship with bakanae disease symptoms expression. *J. Biosci. Bioeng.* **2016**, *4*, 77–89.
45. Perincherri, L.; Lalak-Kańczugowska, J.; Stępień, Ł. *Fusarium*-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions. *Toxins* **2019**, *11*, 664.
46. Xu, X.M.; Parry, D.W.; Nicholson, P.; Thomsett, M.A.; Simpson, D.; Edwards, S.G.; Cooke, B.M.; Doohan, F.M.; Monaghan, S.; Moretti, A.; et al. Within-field variability of *Fusarium* head blight pathogens and their associated mycotoxins. *Eur. J. Plant Pathol.* **2007**, *120*, 21–34.
47. Siciliano, I.; Ortu, G.; Gilardi, G.; Gullino, M.; Garibaldi, A. Mycotoxin Production in Liquid Culture and on Plants Infected with *Alternaria* spp. Isolated from Rocket and Cabbage. *Toxins* **2015**, *7*, 743–754.
48. Gentleman, R. *R Programming for Bioinformatics*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2008.
49. Singtoroj, T.; Tarning, J.; Annerberg, A.; Ashton, M.; Bergqvist, Y.; White, N.J.; Lindegardh, N.; Day, N.P. A new approach to evaluate regression models during validation of bioanalytical assays. *J. Pharm. Biomed.* **2006**, *41*, 219–227.
50. Fumo, N.; Rafe Biswas, M.A. Regression analysis for prediction of residential energy consumption. *Renew Sustain. Energy Rev.* **2015**, *47*, 332–343.
51. Pena, E.A.; Slate, E.H. Global validation of linear model assumptions. *J. Am. Stat. Assoc.* **2006**, *101*, 341.
52. Thyer, M.; Renard, B.; Kavetski, D.; Kuczera, G.; Franks, S.W.; Srikanthan, S. Critical evaluation of parameter consistency and predictive uncertainty in hydrological modeling: A case study using Bayesian total error analysis. *Water Resour. Res.* **2009**, *45*. doi:10.1029/2008WR006825.
53. Schoups, G.; Vrugt, J.A. A formal likelihood function for parameter and predictive inference of hydrologic models with correlated, heteroscedastic, and non-Gaussian errors. *Water Resour. Res.* **2010**, *46*, 79–93.

54. Xiao, W.; Huang, X.; Huang, X.; Chen, Y.; Dai, X.; Zhao, J. Plant regeneration from protoplasts of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ* **2007**, *90*, 191–200.
55. Ploetz, R.C.; Haynes, J.L.; Vázquez, A. Responses of new banana accessions in South Florida to Panama disease. *Crop Prot.* **1999**, *18*, 445–449.
56. Fox, J.; Weisberg, S. *An R Companion to Applied Regression*; Sage Publications: Thousand Oaks, CA, USA, 2018.



©2020由作者提供。被许可方MDPI，瑞士巴塞尔。本文是一篇开放获取文章，遵循知识共享署名(CC BY)许可(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)的条款和条件进行分发。